

Aus dem Institut für Klinische Chemie und molekulare Diagnostik
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Univ.- Prof. Dr. Renz
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg
GmbH, Standort Marburg

Wirkung von Mono(2-ethylhexyl)phthalat auf die Genexpression in Alveolarmakrophagen im allergischen Mausmodell



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christian Keil

aus Koblenz

2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
8. Dezember 2009

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg

Dekan: Univ.- Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. Dr. Wahl

1. Koreferent: PD Dr. Hegele

Michaela und Hubert in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	9
1.1	Weichmacher	9
1.1.1	Adipate	10
1.1.2	Citrate	10
1.1.3	Phosphate	11
1.1.4	Trimellitate	11
1.1.5	Phthalate	12
1.2	Vorkommen und Eigenschaften von DEHP und MEHP	14
1.2.1	Resorption und Verteilung von DEHP und MEHP	15
1.2.2	Metabolismus von DEHP und MEHP	16
1.2.3	Gesundheitsschädliche Wirkungen von DEHP und MEHP	18
1.3	DNA-Microarrays	21
1.3.1	Bedeutung der DNA-Microarrays	21
1.3.2	Technologie der DNA-Microarrays	21
1.4	Ziel der Arbeit	26
2	Material und Methoden	27
2.1	Tierexperimentelle Untersuchungen	27
2.1.1	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	27
2.1.2	Induktion einer Atemwegsreaktion durch Kurzzeitexposition mit MEHP	27
2.1.3	Gewinnung von Serumproben	28
2.1.4	Broncho-alveoläre Lavage	28
2.1.5	Lungenzellsuspension	29
2.2	Molekularbiologische Untersuchungen	31
2.2.1	Zeitabhängige Stimulation von J774 Zellen mit MEHP	31
2.2.2	RNA-Aufreinigung aus einer adhärenenten Zellkultur	31
2.2.3	Qualitätskontrolle der RNA-Aufreinigung mittels Gelelektrophorese	32
2.2.4	DNase-Verdau	33
2.2.5	RNA-Quantifizierung	33

2.2.6	Reverse Transkription	34
2.2.7	Primerdesign	34
2.2.8	Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
2.2.9	Quantifizierung mittels Real-Time-PCR	35
2.2.10	Proben-Normierung über das „Housekeeping Gene“ L32	37
2.2.11	Spezifitätskontrolle der RT-PCR mittels Gelelektrophorese	38
2.2.12	cDNA-Markierung für die Transkriptom-Analyse	39
2.2.13	Gene-Array-Chips	40
2.2.14	Hybridisierung der cDNA auf dem Gene-Array-Chip und Auswertung	40
2.2.15	Statistik	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Untersuchungen der broncho-alveolären Lavage weiblicher BALB/c-Mäuse nach aerosoler Exposition mit MEHP	43
3.2	Untersuchungen in der Zellkultur	44
3.2.1	Auswahl einer Zelllinie für die in vitro-Analysen	44
3.2.2	Transkriptomuntersuchung von J774-Zellen nach Behandlung mit MEHP mittels Microarray	45
3.2.3	Validierung der durch Microarray ermittelten Änderung der Genexpression für Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) und Chemokine Receptor 4 (CXCR 4) nach Behandlung mit MEHP ohne DMSO mittels real time PCR	53
3.2.4	Untersuchung der Beeinflussung der Expression von Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptoren in J774- Zellen nach Exposition mit MEHP ohne DMSO	56
3.3	Beeinflussung der Genexpression in murinem Lungenparenchym durch MEHP	59
3.3.1	Regulierung der Genexpression von Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) und Chemokine Receptor 4 (CXCR 4) in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP	59

3.3.2	Regulierung der Genexpression von Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptoren in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP	60
3.4	Untersuchung der Beeinflussung der Genexpression in murinen Alveolarmakrophagen durch aerosole Exposition mit MEHP	64
3.4.1	Regulierung der Genexpression des Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) durch aerosole Exposition mit MEHP in murinen Alveolarmakrophagen	65
3.4.2	Regulierung der Genexpression des Cheokinreceptors 4 (CXCR4) durch aerosole Exposition mit MEHP in murinen Alveolarmakrophagen	66
3.5	Regulierung der Genexpression von Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptoren (PPARs) durch aerosole Exposition mit MEHP in murinen Alveolarmakrophagen	67
3.5.1	Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors δ durch aerosole Exposition mit MEHP in murinen Alveolarmakrophagen	68
3.5.2	Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors γ durch aerosole Exposition mit MEHP in murinen Alveolarmakrophagen	69
3.5.3	Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors α durch aerosole Exposition mit MEHP in murinen Alveolarmakrophagen	70
3.6	Primerdesign	71
3.6.1	Primer PPAR γ	71
3.6.2	Primer PPAR α	72
3.6.3	Primer PPAR δ	72
3.6.4	Primer CXCR4	73
3.6.5	Primer ADRP	74
4	Diskussion	75
4.1	Aerosole MEHP-Exposition führt zu einem Anstieg der Alveolarmakrophagenzahl in murinem Lungengewebe	76

4.2	Analyse der Einflusses von MEHP auf die Genexpression in J774-Zellen	76
4.2.1	In DMSO gelöstes MEHP führt zu einer Regulierung der Genexpression in J774-Zellen	76
4.2.2	Die Bedeutung von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel	78
4.2.3	MEHP führt zu einer Regulierung der Genexpression in J774-Zellen	78
4.3	Validierung der Ergebnisse der Microarray-Analysen mittels Real Time PCR	79
4.3.1	Eine Exposition mit MEHP führt zu einer Up-Regulation von ADRP in Zellen der Zelllinie J 774	80
4.3.2	Eine Exposition mit MEHP führt zu einer Down-Regulation von CXCR4 in Zellen der Zelllinie J 774	81
4.3.3	Einfluss einer Exposition mit MEHP auf die Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptoren in Zellen der Zelllinie J 774	82
4.4	Änderungen in der Genexpression in Alveolarmakrophagen nach aerosoler Exposition mit MEHP von BALB/c-Mäusen	83
4.4.1	MEHP hat nach aerosoler Exposition keinen signifikanten Einfluss auf die Regulierung der Genexpression von ADRP in Alveolarmakrophagen in Balb/c-Mäusen	84
4.4.2	MEHP führt nach aerosoler Exposition zu einer Up-Regulierung der Genexpression von CXCR4 in Alveolarmakrophagen in Balb/c-Mäusen	85
4.4.3	MEHP führt nach aerosoler Exposition zu einer Up-Regulierung der Genexpression von PPAR δ in Alveolarmakrophagen in Balb/c-Mäusen	86
4.5	Einfluss einer aerosoler Exposition mit MEHP auf die Regulierung der Genexpression im Lungenparenchym von Balb/c-Mäusen	87

4.5.1	MEHP hat nach aerosoler Exposition keinen signifikanten Einfluss auf die Regulierung der Genexpression von ADRP im Lungenparenchym von Balb/c-Mäusen	87
4.5.2	MEHP hat nach aerosoler Exposition keinen signifikanten Einfluss auf die Regulierung der Genexpression von CXCR4 im Lungenparenchym von Balb/c-Mäusen	88
4.5.3	MEHP führt nach aerosoler Exposition zu einer Up- Regulierung der Genexpression von PPAR δ im Lungenparenchym von Balb/c-Mäusen	88
5	Zusammenfassung	90
6	Literaturverzeichnis	94
7	Anhang	105
7.1	Abkürzungsverzeichnis	105
7.2	Abbildungsverzeichnis	107
7.3	Tabellenverzeichnis	110
7.4	Transkriptomanalysen	111
7.5	Übersichtstabelle	118
7.6	Liste der akademischen Lehrer	119
7.7	Danksagung	120

1 Einleitung

Weichmacher sind feste oder flüssige organische Verbindungen, die als Additive bei der Produktion von Kunststoffen, Textilien, Lacken, Zellglas und Dichtungsstoffen eingesetzt werden und für die Elastizität der erwähnten Stoffe sorgen [48]. 1999 wurde erstmals die Verwendung bestimmter Weichmacher in Spielwaren und Babyartikeln vorübergehend verboten, die dazu bestimmt waren, von Kleinkindern unter drei Jahren in den Mund genommen zu werden. Dieses Verbot wurde sukzessive verlängert und gipfelte schließlich am 5. Juli 2005 in einer Richtlinie des Europäischen Parlaments, die besagt, dass zukünftig die sechs Phthalate Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP), Dibutylphthalat (DBP), Benzylbutylphthalat (BBP), Di(isononyl)phthalat (DINP), Di-(isodecyl)phthalat (DIDP) und Di-n-octylphthalat (DNOP) in Babyartikeln und Kinderspielzeug nur zu weniger als 0,1 Masse-% enthalten sein dürfen [70]. Die Diskussion um Weichmacher im Europäischen Parlament ist nach dieser Verabschiedung keineswegs abgeschlossen: auch andere weichmacherhaltige Produkte, vor allem Medizinprodukte, sollen neu überprüft werden.

1.1 Weichmacher

Bis zu hundert verschiedene Weichmacher werden industriell in der kunststoffverarbeitenden Industrie genutzt. Zu den am meisten verwendeten Verbindungen gehören Phthalate, Adipate, Citrate, Phosphate und Trimellitate. Es handelt sich hierbei um Ester der jeweiligen Säuren mit Alkoholen der Kettenlänge C1 bis C17, die je nach Einsatzgebiet idealerweise geruchlos, farblos, licht-, temperatur- und wasserbeständig, nicht gesundheitsschädlich und möglichst wenig flüchtig sein sollten [42].

1.1.1 Adipate

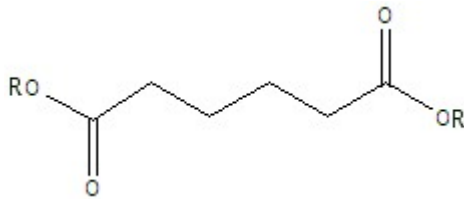


Abb. 1: Adipinsäureester (R bezeichnet Alkoholrest)

Von den Adipinsäureestern wird vor allem Di(2-ethylhexyl)adipat (DEHA) als Weichmacher in der PVC-Herstellung eingesetzt. Adipate zeichnen sich im Gegensatz zu Phthalaten durch bessere Tieftemperatureigenschaften und geringere Plastisolviskosität bei stärkerer Flüchtigkeit, höherer Migrationsfähigkeit und höheren Kosten aus [45], weshalb sie nur in wenigen Produkten, wie zum Beispiel in Frischhaltefolien, eingesetzt werden.

1.1.2 Citrate

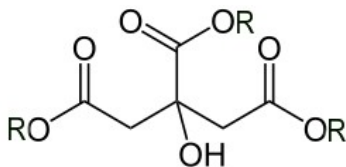


Abb. 2: Zitronensäureester (R bezeichnet Alkoholrest)

Die Ester der Zitronensäure und hier vor allem Acetyltributylcitrat (ATBC) werden unter anderem als Weichmacher im Lebensmittelbereich sowie in der Medizinproduktherstellung in Großbritannien [131] und als Ersatz für die verbotenen Phthalate in Spielwaren und Babyartikeln verwendet, die dazu bestimmt sind, von Kleinkindern unter drei Jahren in den Mund genommen zu werden. Aufgrund ihrer guten Flammfestigkeit werden Citrat-Weichmacher außerdem in der Elektroindustrie eingesetzt. Da sie mikrobiell abbaubar sind, sind sie nur für die Innenanwendung nutzbar.

1.1.3 Phosphate

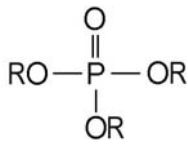


Abb. 3: Phosphorsäureester (R bezeichnet Alkoholrest)

Die Ester der Phosphorsäure zeichnen sich besonders durch ihre hohe Hitzestabilität aus. Da sie eine geringere Plastisolviskosität als Phthalate erzielen, deutlich teurer sind und als umweltgefährlich und humantoxisch eingestuft sind, bleibt ihr Einsatz der Verarbeitung im Rahmen des Brandschutzes vorbehalten.

1.1.4 Trimellitate

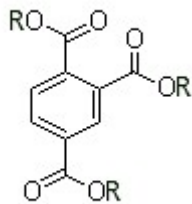


Abb. 4: Trimellitatester (R bezeichnet Alkoholrest)

Trimellitate zeichnen sich besonders durch ihre geringe Flüchtigkeit aus und werden vor allem in der der Automobilindustrie für die Innenausstattung von Kraftfahrzeugen verwendet. Über die Toxizität und Ökotoxizität von Trimellitat-Weichmachern ist bisher sehr wenig bekannt.

1.1.5 Phthalate

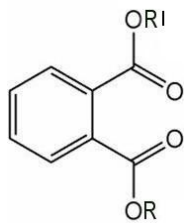


Abb. 5: Phthalsäureester (R bezeichnet Alkoholrest)

R	R'	Substanz
-H	-H	Phthalsäure (PA)
-CH ₃	-CH ₃	Dimethyl-Phthalat (DMP)
-(CH ₂) ₃ CH ₃	-(CH ₂) ₃ CH ₃	Dibutyl-Phthalat (DBP)
-(CH ₂) ₃ CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅	Butyl-Benzyl-Phthalat (BBP)
-CH ₂ CH(CH ₂) ₃ CH ₃ CH ₂ CH ₃	-H	Mono(2-Ethylhexyl)Phthalat (MEHP)
-CH ₂ CH(CH ₂) ₃ CH ₃ CH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH(CH ₂) ₃ CH ₃ CH ₂ CH ₃	Di(2-Ethylhexyl)Phthalat (DEHP)

Tab. 1: Alkoholreste der Phthalsäureester

Aufgrund ihrer günstigen Eigenschaften und einer hohen Kosteneffizienz stellt die Gruppe der Phthalate in Westeuropa einen Marktanteil von bis zu 90 %, was einer jährlichen Produktion von annähernd einer Million Tonnen entspricht [45]. 50 % dieser Menge macht alleine die Produktion von Di-(ethylhexyl)Phthalat (DEHP) aus [12], was einer jährlichen Produktion von annähernd 500.000 Tonnen entspricht [24,102]. Die überwiegende Menge des in Westeuropa produzierten DEHP wird als Weichmacher in der Herstellung von Weich-Polyvinylchlorid (PVC) eingesetzt. Weich-PVC kann bis zu 80 Masse-% Phthalate enthalten [126]. Der Einsatz von Weich-PVC erstreckt sich von Produkten wie Fußbodenbelägen oder Vinyltapeten über Produkte wie Kabelisolierungen, Planen, Rohre, Kabel, Teppichböden bis hin zu Produkten wie Schuhsohlen, Vinyl-Handschuhe, KFZ-Bauteile, Dispersionen, Lacke/Farben, Emulgatoren und Verpackungen. Ein weiteres Einsatzfeld von Weich-PVC und damit von DEHP liegt in der Produktion von Medizinprodukten, wie zum

Beispiel Infusionsbeuteln, Sammelgefäßen, Infusions- und Dialysesystemen, Kathetern und anderen. In diesen medizinischen Produkten kann der Phthalatanteil bis zu 40% betragen [117].

Phthalate sind nicht-kovalent in die Kunststoffmatrix gebunden und können so im Laufe der Zeit und vor allem bei Kontakt mit lipophilen Substanzen wieder aus dem Kunststoff ausgasen oder ausgewaschen werden. Schon seit den frühen 1970er Jahren ist bekannt, dass DEHP und sein Metabolit MEHP mit Blutprodukten [17,135,82] und während der Hämodialyse [71,31,30] in den menschlichen Organismus infundiert werden. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften und der vielseitigen Anwendung sind Phthalate, vor allem DEHP und MEHP, ubiquitär in der Umwelt wie auch in der Bevölkerung nachweisbar.

Medium	Vorkommen	Konzentration
Luft	über Land	0,3 - 2,7 ng/m ³
	über Meer	22 ng/m ³
	über urbanem Gebiet	18,9 ng/m ³
Erde	Boden	1,5 mg/kg Trockengewicht
	Klärschlamm	27,9 - 154 mg/l
Wasser	Oberflächenwasser	0,33 - 97,8 mg/l
	Abwasser	1,74 - 182 mg/l
	Regenwasser	423 ng/l

Tab. 2: DEHP-Vorkommen in der Umwelt (nach [136,27,129])

Aufgrund günstiger Eigenschaften und seiner Kosteneffizienz wird DEHP umfassend industriell eingesetzt. Schon früh konnten in Tierversuchen toxische Effekte auf verschiedene Organsysteme nachgewiesen werden, wobei jedoch bald deutlich wurde, dass die Effekte nicht nur durch DEHP selbst, sondern vor allem durch seine Metaboliten, unter anderem MEHP ausgelöst wurden [130,113,81]. MEHP ist ein Ester der Phthalsäure, der durch Hydrolyse unter Freisetzung von 2-Ethyl-Hexanol aus DEHP entsteht.

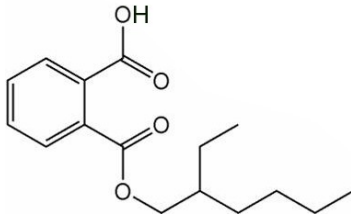


Abb. 6: Mono(2-ethylhexyl)phthalat

1.2 Vorkommen und Eigenschaften von DEHP und MEHP

Durch ihr ubiquitäres Vorkommen und ihre umfassende industrielle Nutzung ist der Mensch einer ständigen Belastung mit Phthalaten ausgesetzt. Die Ausgasung von Phthalaten aus PVC-haltigen Stoffen ist von Faktoren wie Lagerungsdauer oder Umgebungstemperatur, der Auswaschung aus PVC-haltigen Beuteln unter anderem von der Polarität der gelagerten Flüssigkeit abhängig, da Phthalate lipophile Eigenschaften haben und so zum Beispiel leicht aus Bluttransfusionsbeuteln in das beinhaltete Blut ausgewaschen werden können. Über die Exposition der Bevölkerung gegenüber DEHP und seinen Metaboliten existiert keine einheitliche Datenlage. Koch et al. postulierten 2003 eine tägliche Aufnahme von DEHP von 13,8 - 52,8 µg / kg Körpergewicht / Tag [61]. DEHP wird von der Allgemeinbevölkerung vor allem durch Nahrung [14], Innenraumluft und Hausstaub [21] aufgenommen.

Die Aufnahme in Risikogruppen wie zum Beispiel Hämodialysepatienten kann bis zu 3,1 mg / kg Körpergewicht / Tag betragen [49]. Eine weitere Risikogruppe bilden Neonaten, die durch Versorgung mit Infusionen und durch parenterale Versorgung mit lipidreicher Nahrung durch PVC-haltige Infusionssysteme hohen DEHP-Spiegeln ausgesetzt sind [76,58]. Im Rahmen von Austauschtransfusionen bei Neonaten wurden pro Transfusion 0,8 - 3,3 mg DEHP / kg Körpergewicht und 0,05 mg MEHP / kg Körpergewicht übertragen [122]. Da Neonate mit schlechtem Gesundheitszustand besonders vielen medizinischen Interventionen ausgesetzt sind, bei denen sie mit DEHP oder MEHP in Berührung kommen, liegt die Vermutung nahe, dass die totale Aufnahme noch höher liegen dürfte [118]. Die hohe Belastung von Neonaten mit DEHP und MEHP wird noch verstärkt durch eine altersbedingt verminderte renale Clearance und verminderte hepatische Glukuronidierung, was zu einer zusätzlichen Akkumulation im Körper führt.

Altersgruppe	mittlere täglichen DEHP-Aufnahme ($\mu\text{g/kg/KG}$)
Säuglinge (0-6 Monate)	
mit künstlicher Milch gefüttert	5,0
mit Muttermilch gefüttert	7,3
Kleinkinder (7 Monate bis 4 Jahre)	25,8
Kinder (5-11 Jahre)	18,9
Jugendliche (12-19 Jahre)	10
Erwachsene (20-70 Jahre)	8,2

Tab. 3: Geschätzte DEHP-Aufnahme in verschiedenen Altersgruppen [15]

1.2.1 Resorption und Verteilung von DEHP und MEHP

Phthalate können oral, dermal, intravenös und inhalativ aufgenommen werden. Nach einer DEHP-Exposition wird das resorbierte DEHP im menschlichen Körper durch verschiedene Lipasen des Gastrointestinaltraktes und des Blutes zu MEHP hydrolysiert. In einer Studie zur DEHP-Exposition der Bevölkerung 2007 wurden von Fromme et al. primäre und sekundäre DEHP-Metaboliten im Urin bestimmt. Für MEHP wurde hierbei eine mittlere Urinkonzentration von $4,9 \mu\text{g/l}$ gemessen [26]. Bei Versuchen mit Ratten zur toxikokinetischen Beziehung zwischen DEHP und MEHP fanden Koo et al. 2007, dass nach oraler „single dose“-Behandlung der Versuchstiere mit ^{14}C -DEHP T_{max} (h) wie auch C_{max} ($\mu\text{g/ml}$) sowohl in Serum wie auch in Urin für MEHP größer waren als für DEHP [62].

Die Hydrolyse von DEHP zu MEHP wird am effektivsten durch die pankreatische Lipase katalysiert, wohingegen die hydrolytische Aktivität in anderen Organen, wie zum Beispiel der Leber geringer ist [4,49]. Daher ist die Belastung bei oraler Aufnahme größer als bei intravenöser oder inhalativer Aufnahme. DEHP wird hierbei im Gegensatz zu MEHP kaum enteral resorbiert, ist jedoch plazentagängig und wurde auch in Muttermilch nachgewiesen [80,117]. Die Plasma-Halbwertszeiten werden bei gesunder Nierenfunktion mit 10-18 Stunden für DEHP und 3-6 Stunden für MEHP angegeben [21]. Eine weitere Quelle für resorbiertes MEHP besteht in DEHP, welches exogen durch einfache mikrobielle, enzymatische Hydrolyse in aerober Umgebung [64] oder durch chemische Hydrolyse zu MEHP umgesetzt und anschließend resorbiert wird. Über die Verteilung von DEHP und MEHP und ihrer

Metaboliten im menschlichen Körper nach oraler oder inhalativer Aufnahme liegen aktuell keine Daten vor. Untersuchungen an Ratten mit ^{14}C -markiertem DEHP zeigten jedoch eine schnelle Ausbreitung der Radioaktivität in Leber, Nieren, Fettgewebe, Skelettmuskel, Lungen, Testes und Herz. Die Leber wies hierbei die höchste spezifische Aktivität auf [3].

1.2.2 Metabolismus von DEHP und MEHP

Im menschlichen Körper wird DEHP durch Lipasen rasch zu den Primärmetaboliten Mono-(2-ethyl-hexyl)Phthalat und 2-Ethylhexanol abgebaut [97,98]. Im menschlichen Organismus ist im Gegensatz zu Nagetieren eine vollständige Hydrolyse zu Phthalsäure möglich [4,3,119]. MEHP, welches entweder als DEHP resorbiert und zu MEHP hydrolysiert oder direkt als MEHP resorbiert wurde, wird durch P450-abhängige Enzyme weiter oxidiert, wobei seit den siebziger Jahren über 25 verschiedene Metabolite in verschiedenen Oxidationsstufen bekannt sind und in Nagetieren wie auch im Menschen nachgewiesen wurden [119,2,80,120,72,26].

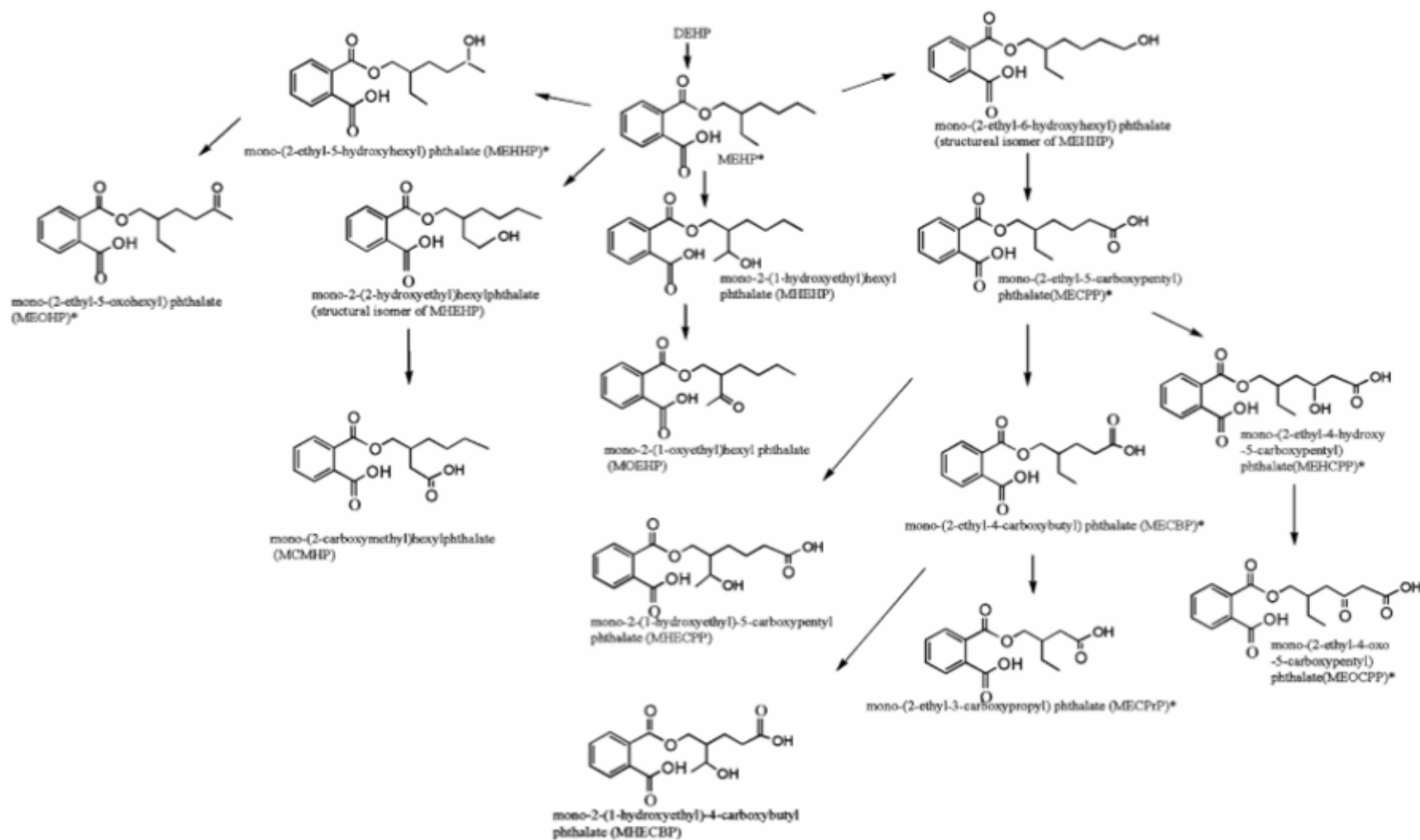


Abb. 7: Metabolismus von DEHP und MEHP im Menschen [119] (* bereits in Nagetieren identifiziert)

1.2.3 Gesundheitsschädliche Wirkungen von DEHP und MEHP

Phthalate haben nur eine geringe akute Toxizität. Die chronisch toxischen Effekte sind jedoch vielfältig und in Tierversuchen vielfach nachgewiesen [118]. Seit über dreißig Jahren ist DEHP der führende Weichmacher in der Weich-PVC-Herstellung. Studien zu Resorption, Metabolismus und Verteilung von DEHP zeigten jedoch, dass nach Inkorporation MEHP als Primärmetabolit für viele der chronisch toxischen Effekte des DEHP verantwortlich ist. Über den Verdauungstrakt oder die Luftwege aufgenommenes DEHP wird hauptsächlich nach Metabolisierung zu MEHP resorbiert und über die Blutbahn im Organismus verteilt [118]. Ein Großteil der hepatotoxischen Effekte des DEHP scheint nach Isenberg et al. 2000 ebenfalls über den Primärmetaboliten MEHP vermittelt zu werden [52].

1.2.3.1 Reproduktionstoxizität

Erste reproduktionstoxische Effekte des DEHP wurden bereits in den 1970er Jahren im Tierversuch nachgewiesen [33,34]. Zahlreiche folgende Studien zeigten, dass eine Exposition gegenüber DEHP die Fruchtbarkeit und Fortpflanzung von männlichen und weiblichen Nagetieren negativ beeinflusst und auch negative Effekte auf die Nachkommen hat. Die beobachteten Effekte reichten von geringeren Wurfgrößen bis hin zu Missbildungen des Reproduktionstraktes, vor allem der männlichen Nachkommen.

Der Hoden scheint gegenüber Phthalaten ein besonders empfindliches Organ zu sein [21,126]. Die Veränderungen reichen von Hodenatrophie über Oligospermie und vollständiger Keimzelldepletion bis hin zur Keimzellhypoplasie und Hemmung der Sertolizellproliferation, die für die FSH-abhängige Spermatogenese verantwortlich ist [73,94-96,121,126,138]. Gray et al. zeigten 1982, dass die toxischen Effekte nach MEHP-Exposition stärker als nach DEHP-Exposition sind [35].

Weibliche Tiere reagieren mit einer Verlängerung der Zyklusdauer, anovulatorischen Zyklen, polyzystischen Veränderungen der Ovarien und Granulosazelldefekten [78,92,134]. Aufgrund der guten Plazentagängigkeit

haben Phthalate auch Auswirkungen auf die in utero exponierten Feten. Die beobachteten Effekte reichen von Spontanaborten, Skelettanomalien oder Neuralrohrdefekten bis hin zu Malformation von Nieren, Hoden oder Herz [29,38,92,101].

1.2.3.2 Wirkungen auf die Immunantwort

Larsen et al. zeigten 2001, dass im Tierversuch die Exposition mit Phthalaten zu einer Modulation der Immunantwort führen kann [67]. Weiterführende Untersuchungen bestätigten dies und konnten nach Stimulation eine potenzierte Antwort von Allergieeffektorzellen zeigen [32]. Lee et. al beschrieben einen Anstieg der Interleukin 4-Freisetzung in murinen CD4+ T-Lymphozyten [69], Takano et. al ein häufigeres Auftreten atopischer Dermatitis nach Phthalatexposition [128]. Es stellte sich heraus, dass die Stimulation mit DEHP und MEHP – den beiden 8 C-Atom langen Phthalaten – einen besonders ausgeprägten Effekt auf die Immunantwort haben. Eine vielschichtige Wirkung von Phthalaten auf die Immunantwort ist in Kenntnis der aktuellen Studienlage anzunehmen. Die beschriebenen Effekte beschränken sich jedoch meist auf die Veränderung einzelner Laborparameter. Ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen Phthalat-Exposition und klinisch-immunologischem Krankheitsbild konnte bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

1.2.3.3 Wirkungen auf die Lunge

Für die Allgemeinbevölkerung stellt die Aufnahme von Phthalaten über den Respirationstrakt eine wichtige Inkorporationsart dar, da durch den täglichen Umgang mit phthalathaltigen Materialien besonders in Innenräumen große Mengen aufgenommen werden können. Erstmals wurde eine akute Lungentoxizität nach Exposition mit DEHP bis hin zum Tode 1975 beschrieben [116]. 1988 wurde von drei Frühgeborenen berichtet, die nach künstlicher Beatmung durch DEHP-haltige Schlauchsysteme ungewöhnliche pulmonale Reaktionen boten. Ein Neugeborenes verstarb, der Zustand der zwei Überlebenden besserte sich nach Austausch der PVC-haltigen

Beatmungssysteme gegen Ethylen-/Vinylacetat-Beatmungssysteme. Im Lungengewebe des verstorbenen Frühgeborenen konnte DEHP nachgewiesen werden [111]. Bornehag et. al. untersuchten 2004 den Zusammenhang zwischen allergischen Symptomen bei Kindern und dem Phthalatgehalt in deren Wohnungen und konnten zeigen, dass das Vorkommen von DEHP bereits bei üblicherweise in der Umwelt vorliegenden Konzentrationen im Hausstaub das Auftreten von asthmatischen Symptomen begünstigt [9]. Im Tierversuch zeigte sich bei pulmonal resorbierten Phthalaten eine Zunahme von Entzündungszellen in der bronchoalveolären Lavage [36] sowie eine deutlich erhöhte phagozytotische Aktivität in Alveolarmakrophagen [6]. Ein Zusammenhang zwischen der zunehmenden Verbreitung von phthalathaltigen Kunststoffen und der Zunahme asthmatischer Erkrankungen wird seit Jahren diskutiert [55].

1.2.3.4 Wirkungen durch Peroxisome proliferator-activated receptors

1990 entdeckten Issemann und Green einen Rezeptor der Steroid-Rezeptor-Superfamilie, der unter anderem durch Phthalate aktiviert wird und so eine Peroxisomenproliferation induziert [53]. Inzwischen sind unterschiedliche Subtypen dieses Rezeptors mit unterschiedlicher Verteilung im Gewebe sowie unterschiedlichen Wirkungen identifiziert. PPAR α wird vor allem in Leber-, Nieren- und Muskelgewebe exprimiert und greift hier durch die Aktivierung entsprechender Enzyme in den Fettsäureabbaustoffwechsel ein [22,99]. PPAR γ wird vorwiegend in Adipozyten und Makrophagen exprimiert und steuert unter anderem Adipozytendifferenzierung, Lipidspeicherung und Glukosestoffwechsel [7,63,110]. PPAR δ ist relativ gleichmäßig über die Gewebe verteilt und spielt unter anderem eine Rolle bei der Wundheilung und der Regulierung der VLDL-Signale in Makrophagen [20,88].

1.3 DNA-Microarrays

1.3.1 Bedeutung der DNA-Microarrays

Daten zur Verwendung von Microarrays zur Transkriptomanalyse wurden erstmals 1995 von Schena et al. veröffentlicht [114]. Seit diesem Zeitpunkt nahm die Anzahl von Arbeiten, die diese Methode verwendeten, exponentiell zu.

Heute gehört die Microarray-Technologie zu einer der Grundsäulen der molekularbiologischen Forschungsarbeit. DNA-Microarrays ermöglichen die simultane Untersuchung von mehreren tausend Transkripten einer Probe in einem Arbeitsschritt. So kann die komplexe Interaktion der Gene einer Zelle mit einem verhältnismäßig geringem Aufwand analysiert werden. Die Expressionsmuster, die sich in solchen Analysen zeigen, können Hinweise hinsichtlich der Regulation und Interaktion von bisher unbekannten Genen geben und die Beteiligung bekannter Genen an neuen Regulationsmechanismen zeigen. Kombiniert man die so gewonnen Erkenntnisse beispielsweise mit bekannten Stoffwechselwegen, können einzelne Regulationsmechanismen, aber auch bisher unbekannte Verbindungen zwischen einzelnen Stoffwechselwegen neu interpretiert und verstanden werden.

1.3.2 Technologie der DNA-Microarrays

Momentan ist eine Vielzahl verschiedener DNA-Microarray-Kits auf dem Markt. Die Grundtechnologie ist jedoch allen Systemen gemeinsam. Kleine DNA-Fragmente, die spezifisch für ein Gen codieren, werden hergestellt und auf einer speziellen Oberfläche (Matrix) fixiert.

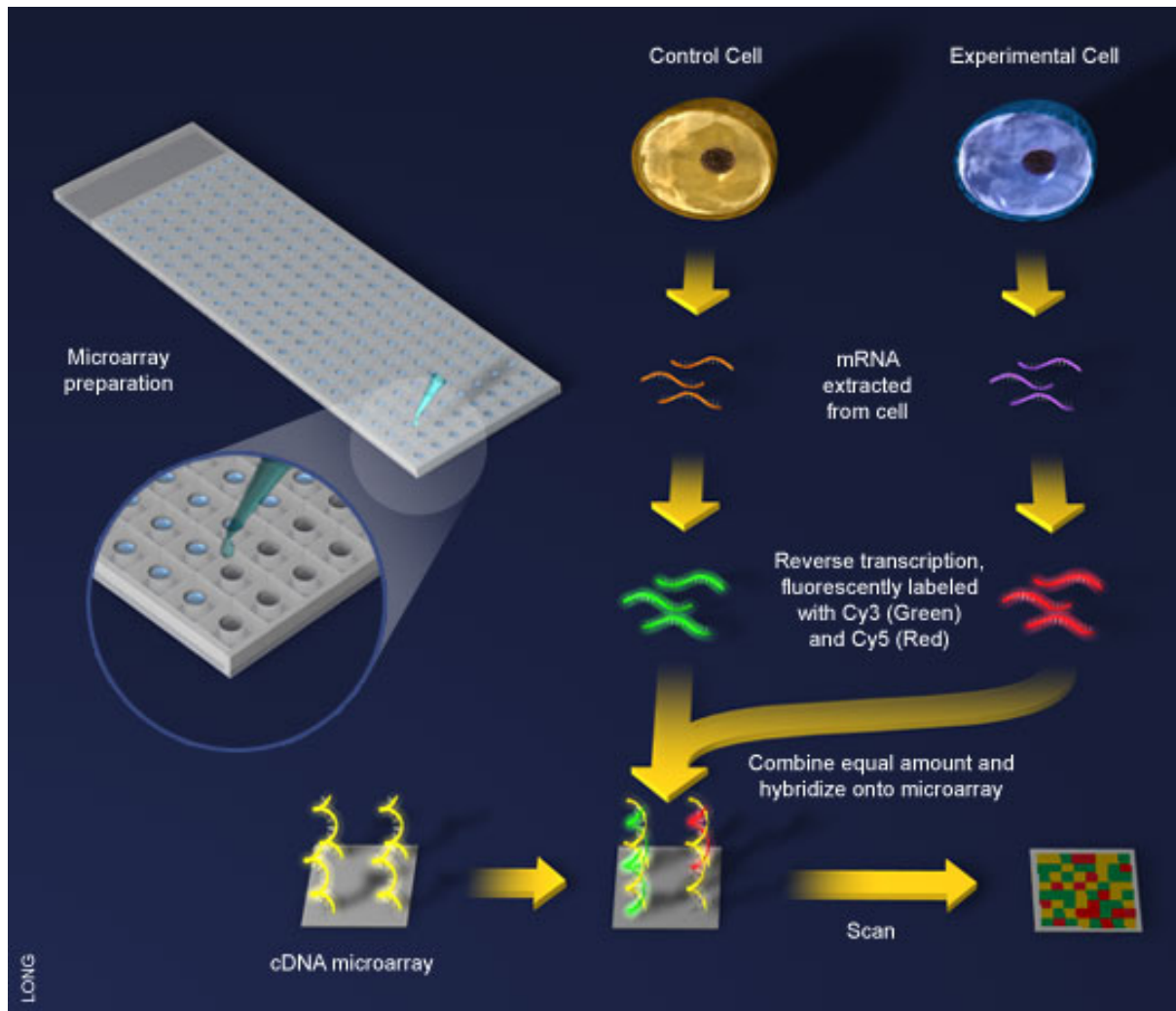


Abb. 8: Abb. Prinzip der Microarray Technologie

Ein PCR-Produkt eines DNA-Klons wird aufgereinigt und mittels Roboter auf eine Glasoberfläche aufgebracht. Die RNA einer zu analysierenden Probe und eine Kontrollprobe werden mit zwei verschiedenen Farbstoffen markiert und so zu fluoreszierender cDNA. Die verschiedenfarbig markierte cDNA der beiden Proben wird gemischt und auf dem Array hybridisiert. Abschließend wird das Array mittels Laser-Scanner analysiert und für jeden Spot eine relative Fluoreszenz-Intensität angegeben [40].

Die zu analysierende DNA wird entsprechend aufgereinigt, mit einem speziellen Farbstoff gekoppelt und kann nun mit den komplementären, bekannten DNA-Fragmenten, die an bekannten Orten (Spots) auf der Matrix aufgebracht sind, hybridisieren. Die Anzahl erfolgter Hybridisierungen pro Spot kann nun einzeln abgelesen und ausgewertet werden. Unterscheiden sich zwei Proben in der

Expression eines bestimmten Genes, resultiert daraus eine unterschiedliche Intensität des gebundenen Farbstoffs auf den korrespondierenden Spots, der mit der entsprechenden Hardware in Zahlwerte umgerechnet werden kann. Diese Technik erlaubt die quantitative Analyse der Genexpression einer Probe gegenüber einer Kontrollprobe für mehrere tausend Gene in einem Arbeitsschritt.

Als Material für die Matrix können verschiedene Materialien, wie zum Beispiel Nylonmembranen, Kunststoff oder Glas verwendet werden. Als eines der ersten nukleinsäurebindenden Materialien setzte Southern für seine Southern-Blot-Methode Nitrocellulose ein [123]. In der jüngeren Vergangenheit haben sich zunehmend auch andere Materialien als Trägersubstanz durchgesetzt. Nylonmembranen etwa zeichnen sich durch gute physikalische Widerstandskraft und Stabilität aus. Die Fixierung von DNA-Fragmenten auf Nylon kann durch Adsorption, Bestrahlung mit UV-Licht oder chemische Aktivierung erfolgen und hat sich als haltbarer und wesentlich effektiver als die Verwendung von Nitrocellulose erwiesen [23]. Grundsätzlicher Nachteil von Nylon-Membranen ist eine zu starke Nukleinsäurebindungskapazität, was dazu führen kann, dass unspezifisch gebundene DNA die Aussagekraft der Methode beeinträchtigt. Nitrocellulose hat eine weit niedrigere Bindungskapazität. Da so auch entsprechend weniger spezifische DNA gebunden wird, ist die resultierende und zu analysierende Farbintensität für die meisten gängigen Meßsysteme zu gering.

Entsprechend bearbeitete Glasoberflächen, die mit Epoxid, Aminosilan oder Poly-L-Lysine beschichtet sind, sind die momentan gängigsten Materialien für die Matrixherstellung. Die Möglichkeiten der Fixierung ähneln denen bei der Verwendung von Glasmatrixen.

Die meisten gängigen Technologien verwenden momentan Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung der DNA entweder im Sinne einer Ein-Farben- oder einer direkt vergleichenden Zwei-Farben-Hybridisierung. Dabei können die Fluoreszenzfarbstoffe entweder direkt während der Synthese der cDNA eingebaut, während der in-vitro-Transkription durch entsprechend markierte Nukleotide zugesetzt oder indirekt durch Verwendung von amino-allylierten Nukleotide zugesetzt werden, die anschließend mit reaktiven Fluoreszenzmarkern gekennzeichnet werden.

Verwendet man zwei unterschiedliche Farbstoffe für die zu untersuchende und eine Kontrollprobe und hybridisiert beide auf die gleiche Matrix, konkurriert die DNA beider Proben um die entsprechenden Spots. Dem Massenwirkungsgesetz folgend bindet die Probe in der mehr komplementäre DNA vorliegt, vermehrt und die Unterschiede in Fluoreszenz und Farbausschlag können mit speziellen Scannern sichtbar und mit geeigneter Software in Zahlwerte umgerechnet werden. Diese Technik erlaubt die quantitative Analyse der Genexpression einer Probe gegenüber einer Kontrollprobe für mehrere Tausend Gene in einem Arbeitsschritt.

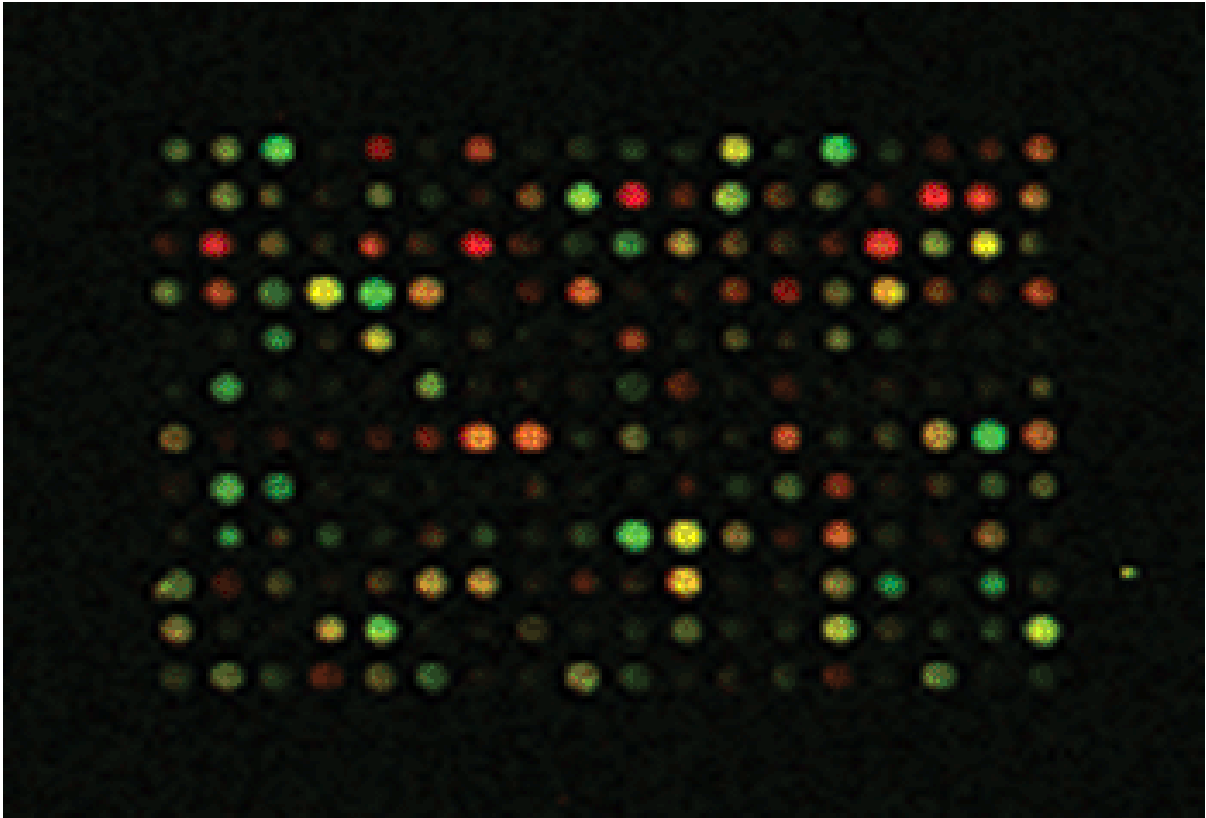


Abb. 9: Ausschnitt aus einem zwei Farben- Microarray unter Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen ausgewertet mittels GMS 418 Array Scanner (Genetic MikroSystems, Woburn, USA)

Eine zu untersuchende Probe wurde mit einem grünen, eine Kontrollgruppe mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und beide auf der gleichen Matrix hybridisiert. Dem Massenwirkungsgesetz folgend bindet die Probe, in der zu einem bestimmten Spot mehr komplementäre DNA enthalten ist, vermehrt an dem entsprechenden Spot. Es resultiert in der Analyse mit speziellen Scannern ein Farbausschlag entweder zu einem roten oder grünen Farbton, der mit der entsprechenden Hardware in Zahlwerte umgerechnet werden kann.

1.4 Ziel der Arbeit

Aus Vorversuchen ist bekannt, dass eine aerosole Exposition von BALB/c-Mäusen mit dem Weichmacher MEHP zu einer pathologischen Atemwegsreaktion führen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den zugrunde liegenden Pathomechanismus auf zellulärer wie mikrobiologischer Ebene näher zu untersuchen.

Hierzu wurde folgende Aufgabenstellung bearbeitet:

1. Aerosole Exposition von weiblichen BALB/c Mäusen mit MEHP mit anschließender Analyse der Zellzusammensetzung der bronchoalveolären Lavage der Versuchstiere
2. Stimulation einer Zelllinie, deren Zellen den Zellen der bronchoalveolären Lavage gleichen, mit MEHP und anschließende Transkriptomuntersuchung mittels Microarray
3. Validierung der in-vitro-detektierten Änderungen der Genexpression in vivo in Zellen der bronchoalveolären Lavage der Versuchstiere mittels Real Time PCR
4. Untersuchung von Änderungen der Genexpression im Lungenparenchym der Versuchstiere mittels Real Time PCR

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt in der qualitativen und quantitativen Analyse des Einflusses von MEHP auf die Änderung der Genexpression in Zellen, die nach aerosoler Exposition vermehrt im Bronchialsystem vorhanden sind. Während viele Arbeiten sich bereits mit dem Einfluss von MEHP auf Hepatozyten und Endothelzellen beschäftigt haben, bleibt der Einfluss auf Zellen des bronchoalveolären Systems bisher weitgehend unbekannt.

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

2.1.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die in-vivo-Studien wurden weibliche BALB/c-Mäuse (Harlan Winkelmann, Borch, D) verwendet. Die Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen bei konstanter Raumtemperatur von 20 °C gehalten und erhielten ovalbuminfreies Futter und Wasser ad libidum. Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden durch das Regierungspräsidium Giessen durch den Antrag V54-19 c 20/15 (1) MR 20/13 Nr. 55/2004 „Mögliche Auswirkungen von Phthalaten und Phthalatmetaboliten auf den Organismus“ genehmigt. Die ethische Abwägung der Versuche erfolgte anhand der von Teutsch und Scharmann verfassten Richtlinien.

2.1.2 Induktion einer Atemwegsreaktion durch Kurzzeiteexposition mit MEHP

Die Wirkung des Weichmachers auf die Atemwege wird im Mausmodell durch eine Aerosolexposition ausgelöst. Dazu werden weibliche BALB/c-Mäuse jeweils zwanzig Minuten lang in einer luftdichten Expositions-kammer mit verschiedenen Weichmacherkonzentrationen MEHP (250 – 2000 µg/mL) exponiert. Das MEHP wird in Wasser gelöst und als Aerosol appliziert. Eine Kontrollgruppe wird analog mit PBS behandelt. Das Aerosol wird dabei von einem Generator (PARI® Master, Pari, Starnberg, D) gebildet. Die Exposition erfolgt von Tag 0 bis 36 im Abstand von 48 Stunden, von Tag 36 bis 39 im Abstand von 24 Stunden. 24 Stunden nach der letzten Challenge erfolgt die Analyse der Versuchstiere.

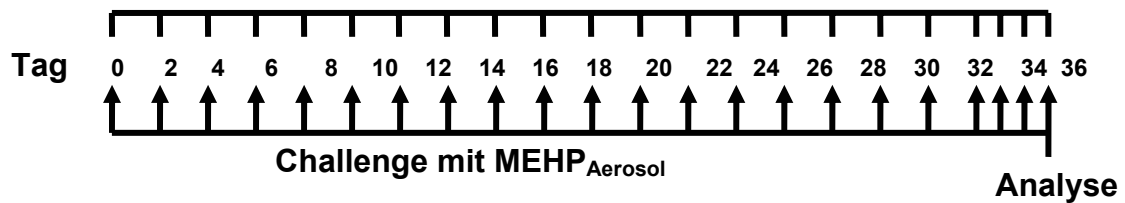


Abb. 10: Protokoll zur Induktion einer Atemwegsreaktion durch Kurzzeitexposition mit MEHP

2.1.3 Gewinnung von Serumproben

Vor der eigentlichen Blutentnahme werden die zu untersuchenden Tiere etwa 10 Minuten in einen Wärmeinkubator bei 60°C eingebracht, um eine Dilatation der peripheren Gefäße herbeizuführen. Anschließend wird durch einen Schnitt die Schwanzvene eingeritzt und das entweichende Blut aufgefangen. Das maximal zu entnehmende Blutvolumen beträgt 500 µl. Danach werden die Blutproben bei Raumtemperatur für 3 Stunden inkubiert, bis das Blut vollständig geronnen ist. Jetzt werden die jeweiligen Proben für 20 Minuten bei 2000 g und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend der Serumüberstand abgenommen. Dieser wird bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

2.1.4 Broncho-alveoläre Lavage

Die broncho-alveoläre Lavage (BAL) dient der Gewinnung von Zellen, die sich innerhalb des broncho-alveolären Lumens befinden. Ferner werden Proteine, die sich in diesem Kompartiment befinden, ausgewaschen. Zunächst erfolgt die Tötung des Tieres durch zervikale Dislokation sowie die anschließende Freilegung der Trachea. In diese wird eine kleine Öffnung geschnitten und eine Spritzennadel eingeführt. Über diese Nadel wird 2 x 0,8 ml eiskaltes PBS (PAA, D) mit dem Protease-Inhibitor Complete™ Mini (Roche, Mannheim, D) in die Lunge appliziert und direkt wieder entnommen. Die Suspension wird im Anschluss für 5 Minuten bei 500 g und 4 °C zentrifugiert.

Die Bestimmung der Zellzahl in der BAL wird mittels CASY® TT-Zellzählsystem (Schärfe System, Reutlingen, D) an 1:2000 verdünnten Proben durchgeführt.

Zur Differenzierung der Leukozyten in der BAL werden 50 µl Probe zunächst mit 150 µl PBS verdünnt und anschließend eine Zytozentrifugation für 5 Minuten bei 320 g durchgeführt (Zytozentrifuge Cytospin 3, Shandon, Frankfurt, D), wobei die in der Probe befindlichen Zellen auf einen Objektträger (76 mm x 26 mm, Mattrand, Marienfeld, D) zentrifugiert werden. Die Präparate werden anschließend 30 Minuten an der Luft getrocknet und mit einer Diff-Quick®-Lösung (Dade-Behring, Marburg, D) gefärbt. Die Zelldifferenzierung erfolgt lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung anhand morphologischer Kriterien.

Die RNA-Aufreinigung wird mittels Invisorb® Spin Cell RNA Mini Kit (Invitex GmbH, Berlin, D) durchgeführt. Die Zellen werden mit 200 µl Lysis Solution R überschichtet, für 1 min in einem DNA-Binding Spin Filter inkubiert und 2 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Lysat wird mit 700 µl Ethanol (70%) versetzt und nach 1 min Inkubation bei 12000 rpm für 2 min durch einen RNA-Binding-Spin-Filter zentrifugiert. Die im RNA-Binding Spin Filter befindliche RNA wird nun nach Herstellerangaben nacheinander einmal mit Wash Buffer R1 und zweimal mit Wash Buffer R2 gewaschen und je für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. In einem Elution-Tube wird der Filter mit 20 µl Elution Buffer R befüllt, für 2 min inkubiert und 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die so gewonnene RNA wird bei -80 °C gelagert.

2.1.5 Lungenzellsuspension

Zur Gewinnung des Lungengewebes muss zuvor die Lunge lavagiert und perfundiert werden, um eine Kontamination der Probe durch Leukozyten aus dem broncho-alveolären Lumen bzw. dem Gefäßsystem zu verhindern. Den zu untersuchenden Tieren (durchschnittliches Körpergewicht: 20g) wird etwa 60 Minuten vor Präparationsbeginn 50 µl Heparinlösung (Liquemin® N5000, Roche, Germany) intraoperitoneal injiziert, um eine spätere Blutgerinnung bei der Perfusion des Lungenkreislaufes zu verhindern. Zu Beginn der Präparation des Tieres wird dieses durch intraperitoneale Injektion von 180 µl eines Ketanest/Rompun-Gemisches (125 mg/ml, Ketamin, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe; 8 mg/ml Rompun2%, Bayer, Leverkusen, Germany) anästhesiert.

Sind keinerlei Reflexe des Tieres mehr vorhanden, beginnt die Präparation mit Eröffnung der Bauchhöhle. Das Tier wird durch Eröffnen der Bauchaorta getötet, um durch Ausbluten möglichst viel Blut aus dem Kreislauf zu entfernen. Anschließend wird der Thorax eröffnet, die Trachea freigelegt und mit einem Trachealkatheter kanüliert. Zunächst wird dann die Lunge über den Trachealkatheter mit 5 ml eiskaltem PBS lavagiert, um die in das broncho-alveoläre Lumen infiltrierten Leukozyten zu entfernen. Jetzt wird mit einer kleinen Inzision das rechte Atrium eröffnet und eine Kanüle in dieses eingeführt. Über diese Kanüle wird nun eiskaltes PBS unter beständigem Druck von 20 cm Wassersäule in den Lungenkreislauf geleitet. Nach Eröffnen des linken Atriums kann das Blut aus dem Lungenkreislauf entweichen. Durch zyklisches Einblasen von Luft aus einer 5 ml Spritze über den Trachealkatheter in die Lungen wird dabei das Blut aus dem Gefäßsystem gedrückt. Die Perfusion muß solange durchgeführt werden, bis die Lunge einheitlich weiß und damit das Blut entfernt ist.

Nach der Perfusion wird die Lunge aus dem Thorax entnommen und in eiskaltem PBS mit einer Spitzschere in 5x5 mm große Stücke zerteilt. Diese werden in einen Zell-Shredder (79400S Medicons, 50 µm DAKO Cytomation, Hamburg, DK) gegeben und mittels DAKO Medimachine (DAKO Cytomation, Hamburg, DK) zwei Minuten lang zerrieben. Die Lunge wird während dieses Prozesses durch ein Stahlnetz mit 50 µm Porendurchmesser gerieben. Durch fünfmaliges Spülen des Shredders mit eiskaltem PBS wird eine Lungenzellsuspension hergestellt, die zunächst auf Eis gelagert wird.

Die Aufreinigung von RNA aus dieser Zellzellsuspension wurde mittels eines RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Um die RNA-Probe von verunreinigender DNA zu reinigen, wurde während der RNA-Aufreinigung ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurden 10 µl DNase (Invitrogene, Karlsruhe, Germany) während der RNA-Aufreinigung auf die RNA-Säulen-Membran gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

2.2.1 Zeitabhängige Stimulation von J774 Zellen mit MEHP

Zur Beurteilung möglicher Einflüsse von MEHP auf murine Makrophagen werden Zellen der mononukleären, adhärenent wachsenden Zelllinie J774 zeitabhängig mit MEHP stimuliert. Nach einer Wachstumsphase von 2 Tagen bilden die Zellen einen konfluenten, adhärenenten Zellrasen in der Kulturflasche in 20 ml Medium und werden mit 1000 µmol/L MEHP in DMSO in einem Brutschrank (Heraeus, Berlin, D) für 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ stimuliert. Die Konzentration wird so gewählt, dass die DMSO-Konzentration im Medium bei 2 % liegt. Als Kontrolle dient eine mit DMSO stimulierte Probe. Alle Stimulationsversuche erfolgen in Doppelbestimmung.

Um einen möglichen Einfluss von DMSO auf die Zellen der Zelllinie J774 zu untersuchen, wird eben genannter Versuchsaufbau ohne DMSO wiederholt. MEHP wird dabei direkt in 37 °C warmem RPMI 1640-Medium (PAA, Linz, D) gelöst. Die Konzentration wird so gewählt, dass die MEHP-Konzentration im Medium bei 1000 µmol/L liegt. Die Stimulationszeit liegt bei 6 Stunden, als Kontrolle dient eine mit RPMI stimulierte Probe.

2.2.2 RNA-Aufreinigung aus einer adhärenenten Zellkultur

Die Aufreinigung von RNA aus einer adhärenenten J774 Zellkultur wird mittels PqGOLD TriFast™ solution Kit (Pqqlab, Erlangen, D) durchgeführt. Diese Vorgehensweise ergibt sich aus der Tatsache, dass sich nur mit dem PqGOLD TriFast™ solution Kit (Pqqlab, Erlangen, D) nach der folgend beschriebenen Methode eine für die Transkriptomanalyse mittels DNA-Array genügend hohe RNA-Konzentration erzielen lässt.

Nach Absaugen des Mediums und Spülung mit PBS wurden 4 ml PqGOLD TriFast™ solution in die Kulturflasche gegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird 1 ml Lysat in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und mit 0,2 ml Chloroform (Pqqlab, Erlangen, D) aufgeschüttelt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgt für 5 Minuten eine Zentrifugation bei

12.000 g. Anschließend wird der wässrige Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und mit 0,5 ml Isopropanol (Peglab, Erlangen, D) versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 12.000 g bei 4°C für 10 min, wird der Isopropanolüberstand abgesaugt und das RNA-Pellet laut Protokoll mit Ethanol (75%) gewaschen. Nach Trocknung der RNA-Pellets an der Luft werden alle Pellets in 20 µl RNase-freies Wasser aufgenommen, um so eine möglichst hohe RNA-Konzentration zu erzielen.

2.2.3 Qualitätskontrolle der RNA-Aufreinigung mittels Gelelektrophorese

Die Qualität der RNA-Aufreinigung wird mittels Agarose-Gel-Elektrophorese überwacht. Zu Beginn des Versuchs werden alle Utensilien mit RNA-Eraser gereinigt, um Verunreinigungen vorzubeugen. Hierzu werden 1 g Agarosepulver in 100 ml TAE-Puffer unter Erwärmung in der Mikrowelle gelöst, das abkühlende Gemisch in eine EasyCast UVT Gel-Platte gegossen und entsprechende Kämme eingesetzt. Nach Erkaltung des Gels und Entfernung der Kämme wird die Platte in die Pufferkammer des EasyCast™ Elektrophoresesystems eingesetzt und die Kammer laut Herstellerangaben mit TBE-Puffer befüllt. 1,5 µg RNA werden auf 20 µl mit Sample Buffer aufgefüllt und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Je 15 µl dieses Gemisches werden in die Taschen des Gels gefüllt und das Elektrophoresesystem für 60 min an einen Strom von 100 V, 100 mA und 30 W angeschlossen. Unter UV-Licht wird das Ergebnis sichtbar gemacht und fotografiert.

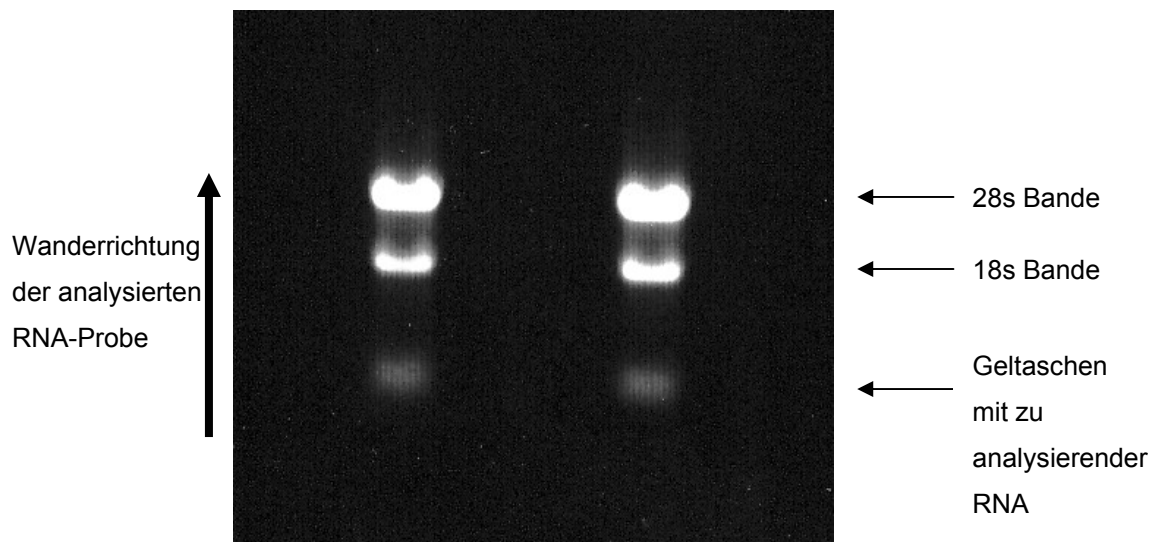


Abb. 11: Gelelektrophorese gereinigter RNA

In der Abbildung kommen unter UV-Licht je die 28s sowie die 18s Bande zur Darstellung. Es liegt eine RNA-Probe ohne relevante Verunreinigung vor. Bei Verunreinigung würden sich in Wanderrichtung außer den dargestellten Banden weitere Banden zeigen.

2.2.4 DNase-Verdau

Um die RNA-Proben von verunreinigender DNA zu reinigen wird ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wird zu 1 µg isolierter RNA 1 µl 10 x DNase I Puffer (DNase I, Amplification Grade, Invitrogen, Karlsruhe, D) sowie 1 µl DNase I (DNase I, Amplification Grade, Invitrogen, Karlsruhe, D) gegeben und das Gemisch bis auf 10 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden 1 µl 0,25M EDTA (DNase I, Amplification Grade, Invitrogen, Karlsruhe, D) zugegeben. Die Lösung wird zunächst bei 60 °C für 10 min inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

2.2.5 RNA-Quantifizierung

Der RNA-Gehalt einer 1:100 verdünnten Probe wird durch eine Absorptionsmessung mittels Gene Quant II (RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgt mittels einer Dreifachmessung mit 5 Sekunden Absorptionszeit.

2.2.6 Reverse Transkription

Im Rahmen der Reversen Transkription wird die aufgereinigte RNA als Matrize für die Synthese eines cDNA-Stranges verwendet, der als Produkt aus dieser Reaktion hervorgeht. Es werden zu 1 µg RNA (Probe) in 10 µl RNase freiem Wasser (s. DNase-Verdau) 2 µl 10 x RT-Puffer (Omniscript Reverse Transcription Kit, Quiagen, Hilden, D), 2 µl dNTP's (5mM pro dNTP) (Quiagen, Hilden, D), 1 µl Random Hexamere (100ng/µl) (Amersham Biosciences, Amersham, UK) sowie 1 µl Omniscript Reverse Transkriptase (Quiagen, Hilden, D) in ein RNase-freies Reaktionsgefäß gegeben und der Reaktionsansatz bis zu einem Endvolumen von 20 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Dieser Reaktionsansatz wird dann für 60 Minuten bei 37 °C und danach für weitere 5 Minuten bei 93 °C inkubiert.

2.2.7 Primerdesign

Für das Primerdesign wird Primer Picker, eine im Internet frei verfügbare Software, verwendet [47]. Es wird darauf geachtet, dass die Länge der Primer zwischen 18 und 20 Nukleotiden liegt, da die Primer-Spezifität mit abnehmender Länge sinkt, jedoch ab einer Primerlänge von 24 Nucleotiden keine Erhöhung der Spezifität mehr erzielt werden kann. Des Weiteren wird beachtet, dass der GC-Gehalt der Primer zwischen 40 % und 60 % liegt, die Basen gleichmäßig verteilt sind und die Schmelztemperatur, bei der 50 % der Primer-cDNA-Hybride als Einzelstränge vorliegen, zwischen 55 °C und 65 °C liegt.

2.2.8 Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die quantitative Verifizierung der Ergebnisse der Array-Analysen sowie die Quantifizierung der relativen Expression der Transkriptionsfaktoren PPAR α , PPAR γ sowie PPAR δ werden mittels Light Cycler System (Roche, Mannheim, D) durchgeführt. Dazu werden 0,5 µg DNA Probe als Matrize für die PCR verwendet. Diesem werden 10 µl 2-fach QuantiTect™ SYBR® Green PCR

Master Mix sowie 1 µl 0,5 µM Forward bzw. Reward Primer (Metabion, Planegg-Martinsried, D) für die entsprechenden Gensequenz der Transkriptionsfaktoren hinzugefügt. Insgesamt werden zur Analyse 45 Zyklen durchgeführt. Dabei beträgt die Denaturierungstemperatur 94 °C, die Annealingtemperatur 55 °C und die Extensionstemperatur 72 °C.

2.2.9 Quantifizierung mittels Real-Time-PCR

Die Quantifizierung der PCR-Produkte wird mithilfe der LightCycler Software Version 3.5 durchgeführt. Da die in den initialen Zyklen auftretende Fluoreszenz unspezifisch ist, wird sie durch ein „Noise Band“ aus der Quantifizierung ausgeschlossen, welches im unteren Teil der log-linearen Amplifikations-Phase liegt. Die Software legt eine „Crossing Line“ als Voreinstellung in Höhe des „Noise band“ fest. Kreuzen die Fluoreszenzwerte der Proben diese „Crossing-Line“, haben sie alle die gleiche Fluoreszenz und somit die gleiche Anzahl an Amplifikationsprodukten. In dieser log-linearen Phase der Amplifikation liegen die wichtigsten Informationen für die Quantifizierung, da alle Proben mit einer vergleichbaren Effizienz amplifiziert werden. Es folgt eine Sättigungsphase, in der keine signifikante Zunahme der PCR-Produkte mehr erfolgt.

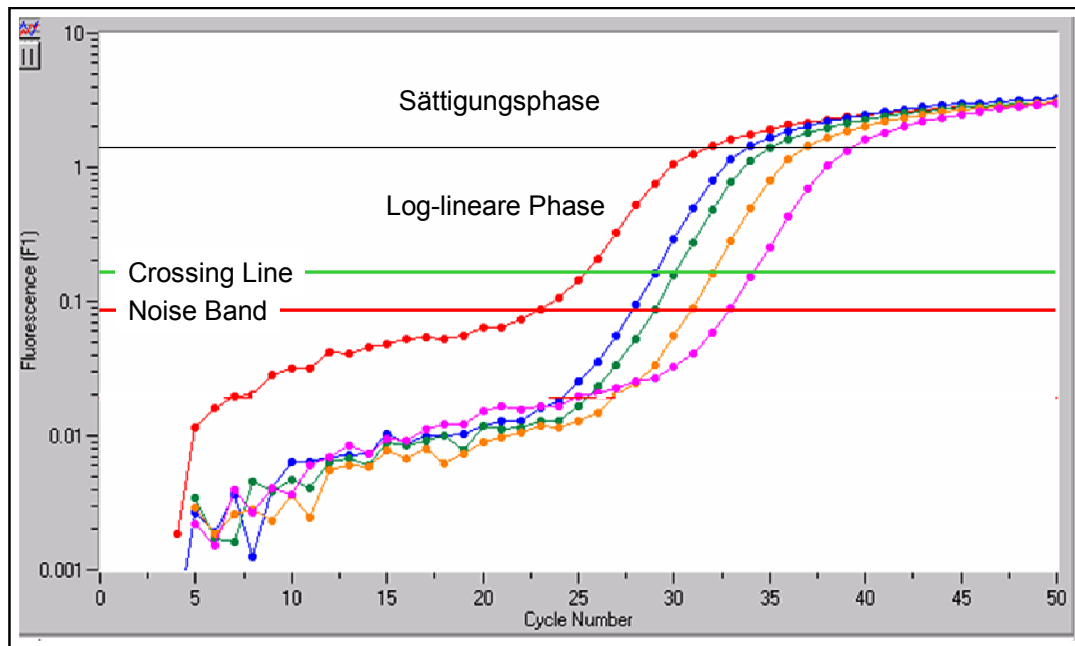


Abb. 12: Amplifikationsphasen während der Real-Time-PCR

(erstellt mit der LightCycler Software Version 3.5)

Anhand der unterschiedlichen Zyklenzahl am „Crossing Point“ kann mithilfe einer Standardkurve die Ausgangskonzentration der Zielsequenz berechnet werden. Die Standardkurve wird durch Bestimmung der „Crossing Points“ von 4 bis 5 verschiedenen Verdünnungen einer Probe mit bekanntem Verdünnungsfaktor erstellt. Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe wird logarithmisch gegen die „Crossing Points“ der einzelnen Verdünnungen aufgetragen und somit wird eine lineare Regressionsgerade erstellt.

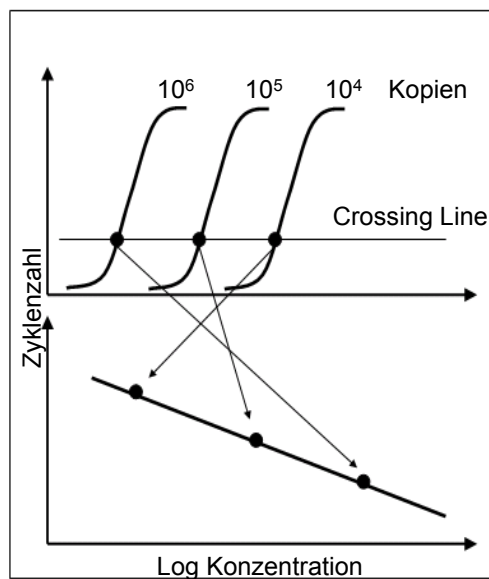


Abb. 13: Erstellen einer Standardkurve

Mittels LightCycler Software Version 3.5 kann so eine „Crossing Line“ errechnet werden, die einen minimalen Abstand der Punkte von der Regressionsgeraden garantiert. Durch eine so definierte Beziehung zwischen „Crossing Point“ und Konzentration der Zielsequenz in der zu untersuchenden Probe können die Proben relativ miteinander verglichen werden.

2.2.10 Proben-Normierung über das „Housekeeping Gene“ L32

Ein „Housekeeping Gene“ ist, per definitionem, ein Gen, dessen Expression sich unter den jeweiligen unterschiedlichen experimentellen Bedingungen nicht ändert. Die Expression eines „Housekeeping Genes“ und somit auch die Menge an mRNA dieses Gens in stimulierten und unstimulierten Zellen sind somit gleich. In der vorliegenden Arbeit wird das ribosomale Protein L32 als „Housekeeping Gene“ verwendet. Nach Messung der Konzentrationen an L32 mittels RT-PCR am LightCycler werden die Proben so verdünnt, dass die Konzentration an L32 in den Proben gleich ist. Der Verdünnungsfaktor errechnet sich aus den Konzentrationen der verschiedenen Proben berechnet durch die LightCycler Software Version 3.5. In den so normalisierten Proben werden die Menge an mRNA für PPAR α , PPAR γ , PPAR γ , CXCR-4 und ADRP

bestimmt und die behandelten und unbehandelten Zellen relativ miteinander verglichen.

2.2.11 Spezifitätskontrolle der RT-PCR mittels Gelelektrophorese

Die Spezifität der PCR wird mittels Agarose-Gel-Elektrophorese überwacht. Hierzu werden 1,5 g Agarosepulver in 100 ml TAE-Puffer unter Erwärmung in der Mikrowelle gelöst, der abkühlenden Lösung 5 µl Ethidium-Bromid zugefügt und das Gemisch in eine EasyCast UVT Gel-Platte gegossen und entsprechende Kämme eingesetzt. Nach Erkalten des Gels und Entfernung der Kämme werden die Platte in die Pufferkammer des EasyCast™ Elektrophoresesystems eingesetzt und die Kammer laut Herstellerangaben mit TBE-Puffer befüllt. Je 5 µl des PCR-Produktes werden mit 1 µl GLS versetzt und 5 µl dieses Gemisches in die Taschen des Gels gefüllt. Die letzte Geltasche wird mit 5 µl Marker befüllt und das Elektrophoresesystem für 60 min an einen Strom von 100 V, 100 mA und 30 W angeschlossen. Unter UV-Licht werden die PCR-Produkte sichtbar gemacht und fotografiert.

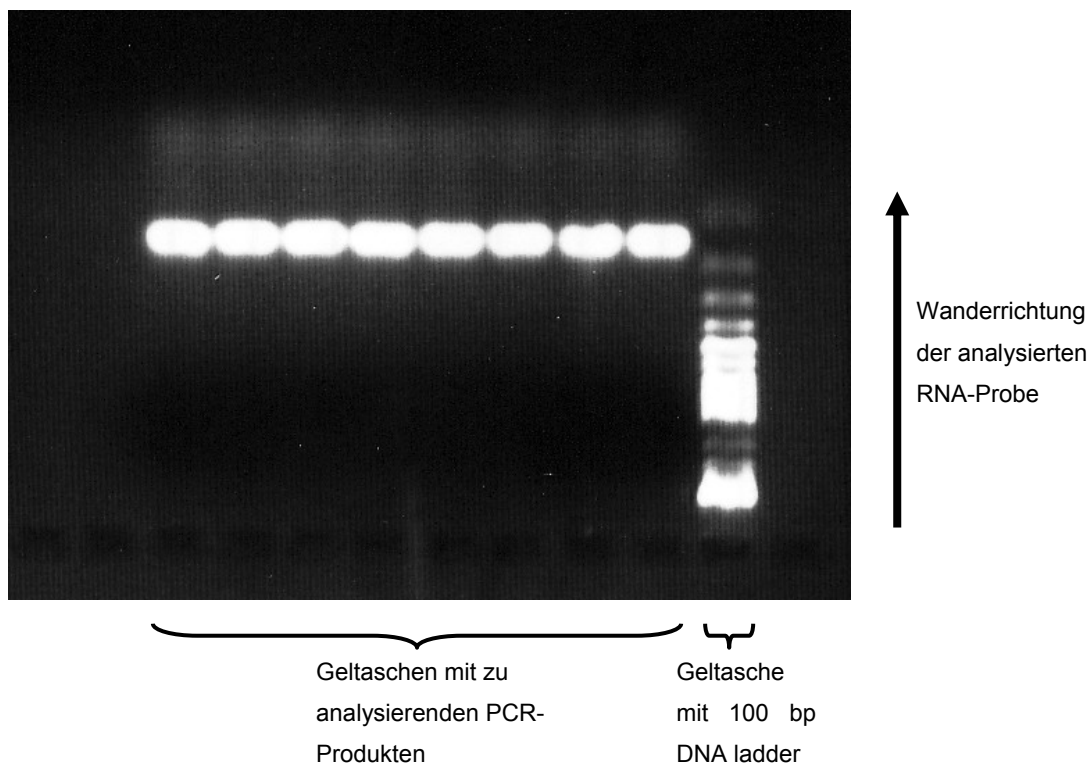


Abb. 14: Gelelektrophorese von PCR-Produkten

2.2.12 cDNA-Markierung für die Transkriptom-Analyse

Für die Transkriptomanalyse einer Probe wird eine weitere Probe benötigt, um eine relative Veränderung der Genexpression angeben zu können. In dieser Arbeit wird die Genexpression in J774-Zellen nach 6-stündiger Stimulation mit 1000 µmol/L MEHP (s. 2.2.1) mit einer nicht stimulierten Kontrollgruppe verglichen. Die Transkriptomanalyse wird mit DMSO als Lösungsmittel und in einer zweiten Versuchsreihe ohne DMSO als Lösungsmittel durchgeführt (s. 2.2.1). Für die Markierung der DNA wird eine Reverse Transkription unter Verwendung des CyScribe cDNA Post Labelling Kits (Amersham Biosciences, Freiburg, D) durchgeführt. Hierbei werden amin-modifizierte Nukleotide als Bausteine der zu produzierenden cDNA verwendet. Bei diesen Modifikationen handelt es sich um Amino-Allyl-Reste, an die in der folgenden Labelling-Reaktion die Farbstoffe Cy3 bzw. Cy5 gekoppelt werden. Die für die Reaktion nötige RNA-Konzentration von 40 µg RNA in 8 µl RNase-freiem Wasser wird auf der Ebene der RNA-Aufreinigung mittels PeqGOLDTM TriFast solution Kit (s. 2.2.2) erreicht, indem die gesamte, aus je 4 Kulturflaschen extrahierte, RNA in 20 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen wurde.

Nach Zugabe von 3 µl Oligo dT Primer (Amersham Biosciences, Freiburg, D) zur RNA-Probe erfolgt eine Inkubation für 5 min bei 70 °C und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 4 µl 5x CyScript Buffer, 2 µl 0,1M DTT, 1 µl 20x dNTP-Mix, 1 µl aadUTP und 1 µl CyScript Reverse Transkriptase (alle Amersham Biosciences, Freiburg, D) wird die Probe für 90 min bei 42 °C inkubiert. Nach Zusatz von 2 µl 2,5M NaOH wird die Probe für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend 10 µl 2M HEPES Free Acid zugegeben.

Zur anschließenden Aufreinigung wird ein PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden, D) laut Herstellerangaben verwendet und die abschließend eluierte Probe in einer Vakuum-Zentrifuge auf ein Volumen von 15 µl ankonzentriert.

Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 werden in 15 µl 0,1M NaHCO₃ (pH 9) aufgenommen, mit der vorbereiteten Probe vermischt und bei Raumtemperatur für 1 h im Dunkeln inkubiert, um die Fluoreszenz der lichtempfindlichen Farbstoffe nicht zu beeinträchtigen.

Nach der Inkubation werden beide Proben in 300 µl PB-Puffer (Qiagen, Hilden, D) in dieselbe QIAquick-Säule (Qiagen, Hilden, D) gegeben und es erfolgt erneut eine Aufreinigung mittels PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden, D) laut Herstellerangaben. Abschließend wird die QIAquick-Säule (Qiagen, Hilden, D) zweimalig mit 30 µl Wasser (pH 8-9) befüllt, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und je für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 20 µl Cot 1 sowie 4 µl PolyA wird die Probe in einer Vakuum-Zentrifuge auf 26 µl ankonzentriert. PolyA verhindert hierbei, dass es zu unspezifischen Hybridisierungen kommt, indem es sich an die Oligo dt-Schwänze der cDNA-Klone anlagert.

Abschließend wird der Probe 10 µl 20x SSC sowie 4 µl 2% SDS zugefügt und die Probe für 2 min auf 95 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt, um zu erreichen, dass die Proben-cDNA in Einzelstrang-Form vorliegt. Nun wird die Probe in Sandwichtechnik auf die präparierten Slides aufgebracht.

2.2.13 Gene-Array-Chips

In der vorliegenden Arbeit werden 10.000-Gene-Spot-Matrices aus Glas verwendet, die freundlicherweise durch die Gene-Array-Unit des Instituts für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg hergestellt und zur Verfügung gestellt wurden. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt mithilfe amin-modifizierter Nukleotide als Bausteine der zu produzierenden cDNA. Bei diesen Modifikationen handelt es sich um Amino-Allyl-Reste, an die in der folgenden Labelling-Reaktion zwei Farbstoffe gekoppelt werden.

2.2.14 Hybridisierung der cDNA auf dem Gene-Array-Chip und Auswertung

In der vorliegenden Studie wird die Hybridisierung der cDNA auf dem Gene-Array-Chip als Doppelbestimmung in Sandwich-Technik durchgeführt. Hierbei wird die Probe auf einen Slide aufgebracht und ein zweiter Slide so darauf platziert, dass die beiden bedruckten Bereiche aufeinander zu liegen kommen.

Für jeden Versuch werden zwei Gene-Array-Untersuchungen in Sandwichtechnik durchgeführt.

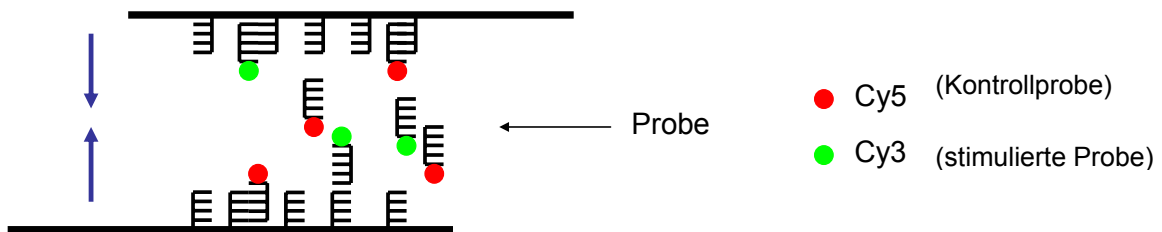


Abb. 15: Hybridisierung in Sandwich-Technik

Parallel zur Probenmarkierung erfolgt eine Blockierung der Slides, um Hintergrundartefaktbildungen zu minimieren. Hierzu werden die Slides für 30 min bei 55 °C in einem Blocking-Reagenz inkubiert, das sich aus 1,36 ml BSA (0,22g/ml), 4,44 ml 20x SSC-Puffer, 0,3 ml 10% SDS-Puffer und 23,9 ml autoklaviertem Aqua Bidest zusammensetzt. Anschließend werden die Slides für 3 min in 200 ml autoklaviertem Aqua Bidest gewaschen, für 3 min bei 1500 rpm trocken zentrifugiert und das Probengemisch in die Mitte der bedruckten Fläche eines Slides aufgebracht, wobei auf völlige Luftblasenfreiheit zu achten ist. Ein zweites Slide wird so auf dem ersten platziert, dass sich das Probengemisch zwischen den bedruckten Flächen der beiden Slides luftblasenfrei ausbreiten kann.

Zur Hybridisierung wird der Slide-Sandwich in ein 50 ml Falcon-Röhrchen verbracht, wobei darauf zu achten ist, dass die beiden Slides nicht gegeneinander verrutschen. Um ein Austrocknen der Probe zu verhindern, wird ein halbes gefaltetes Kimwipes Lite-Tuch mit einem Gemisch aus 230 µl 3x SSC, 15 µl 10% SDS und 1255 µl autoklaviertem Aqua Bidest benetzt, in das Falcon Röhrchen vorgelegt und der Schraubverschluß mit selbsthaftender Folie verschlossen. Das so präparierte Gene-Array wird bei 55 °C für 14 h inkubiert.

Anschließend werden die Slides in einem Gefäß mit autoklaviertem Aqua Bidest voneinander getrennt, um Hintergrundartefaktbildung zu vermeiden. Nach Trennung der beiden Slides werden sie je dreimal für 5 min in 200 ml Waschlösung 1 (3 ml 20x SSC, 6 ml 10% SDS, 591 ml Aqua Bidest autoklaviert), je zweimal für 5 min in 200 ml Waschlösung 2 (2 ml 20x SSC, 398

ml Aqua Bidest autoklaviert) und abschließend einmal für 20 sec. in autoklaviertem Aqua Bidest gewaschen sowie für 3 min bei 1500 rpm trocken zentrifugiert.

Die Messung der Fluoreszenzintensitäten der Cy3- bzw. Cy5-markierten Proben wird mittels GMS 418 Array Scanner (Genetic MikroSystems, Woburn, USA) gemessen und mittels Genepix Pro 6.0 Software (Genetic MikroSystems, Woburn, USA) auf einem Personal Computer ausgewertet.

2.2.15 Statistik

Die graphischen und statistischen Auswertungen werden unter Verwendung von GraphPad Prism® sowie von Microsoft Excel durchgeführt. Sämtliche Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) verzeichnet. Zur Überprüfung von Unterschieden zwischen den Vergleichsgruppen auf statistische Signifikanz wird der „Unpaired t-Test“ verwendet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als Signifikanzniveau festgelegt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,01$).

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen der broncho-alveolären Lavage weiblicher BALB/c-Mäuse nach aerosoler Exposition mit MEHP

Nach einer aerosolen Exposition weiblicher BALB/c-Mäuse nach oben genanntem Expositionsschema (s. 2.1.2 ff.) wird nach zervikaler Dislokation eine broncho-alveoläre Lavage (BAL) der einzelnen Versuchstiere gewonnen. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der enthaltenen Zellzahlen. Nach entsprechender Verarbeitung und lichtmikroskopischer Analyse wird deutlich, dass das ausgewaschene Infiltrat fast ausnahmslos aus Makrophagen besteht. Alle weiteren Analysen werden bei Tieren der mit 500 µg/ml MEHP stimulierten Gruppe durchgeführt.

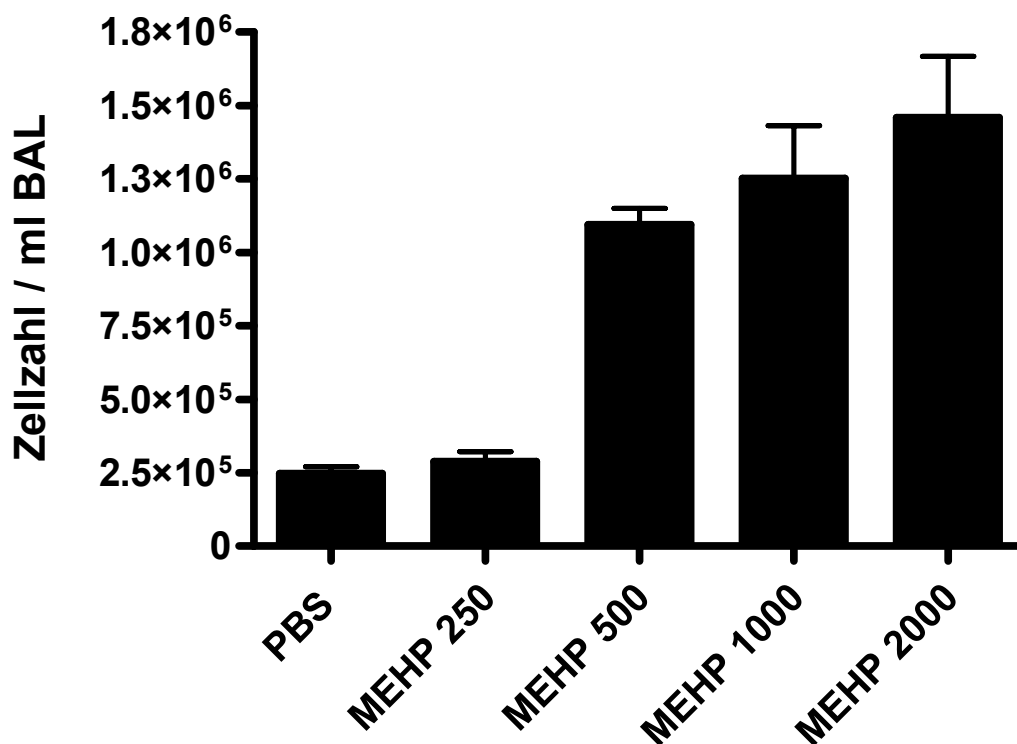


Abb. 16: Konzentrationsabhängiger Anstieg der Anzahl an Makrophagen in der bronchoalveolären Lavage nach aerosoler Exposition weiblicher BALB/c-Mäuse mit MEHP

Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M.

3.2 Untersuchungen in der Zellkultur

3.2.1 Auswahl einer Zelllinie für die in vitro-Analysen

Da die Analyse der broncho-alveolären Lavage der Versuchstiere aus dem Tierversuch eine signifikante Zunahme der Zahl an enthaltenen Alveolarmakrophagen ergab, werden für die weiteren in vitro-Analysen Zellen verwendet, die den murinen Alveolarmakrophagen in Morphe und Eigenschaften möglichst nahe kommen. In der vorliegenden Studie werden Zellen der Zelllinie J774 verwendet. Es handelt sich hierbei um Monocyten/Makrophagen aus weiblichen BALB/c Mäusen. Die Zellen sind in der Lage, Interleukin 1 und Lysozym zu synthetisieren und exprimieren Komplement- und Fc-Rezeptoren [41].

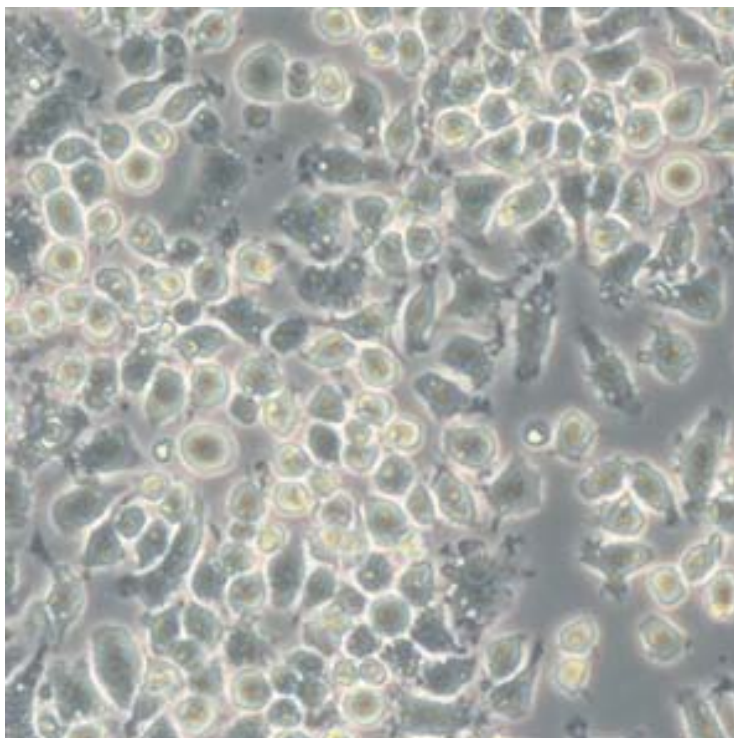


Abb. 17: J774-Zellen in 200-facher Vergrößerung [nach 43]

3.2.2 Transkriptomuntersuchung von J774-Zellen nach Behandlung mit MEHP mittels Microarray

In einem Stimulationsversuch werden Zellen der J774-Zelllinie, wie in Material und Methoden beschrieben, für sechs Stunden mit MEHP stimuliert. Die MEHP-Konzentration im Medium liegt bei 1000 $\mu\text{mol/L}$.

3.2.2.1 Transkriptomuntersuchung mittels Microarray unter Verwendung von DMSO als Lösungsmittel

In der vorliegenden Arbeit wird in einer Versuchsreihe MEHP so in DMSO gelöst, dass die DMSO-Konzentration im Medium bei 2 % liegt. Die Zellen werden in einem Stimulationsversuch für sechs Stunden mit MEHP stimuliert, wobei die MEHP-Konzentration im Medium bei 1000 $\mu\text{mol/L}$ liegt. Als Kontrolle dient eine mit DMSO stimulierte Probe. Alle Versuchsansätze sowie die Auswertung mittels DNA-Microarray erfolgen in Doppelbestimmung. In der folgenden Abbildung sind die Änderungen der Genexpression aufgeführt.

Gen-Name	Fold change
Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	+ 9,8
Signal transducer and activator of transcription 3	+ 9,7
Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	+ 8,0
Metallothionein 2	+ 5,7
Translocated promoter region	+ 5,7
Coiled-coil domain containing 69	+ 5,5
Interferon-related developmental regulator 1	+ 5,5
Peptidyl-prolyl isomerase G (cyclophilin G)	+ 5,3
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	+ 5,2
Metallothionein 2	+ 4,9
Peptidyl-prolyl isomerase G (cyclophilin G)	+ 4,7
Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)	+ 4,6
Structural maintenance of chromosomes 4	+ 4,6
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36	+ 4,4
Myeloid differentiation primary response gene 116	+ 4,3

Remodeling and spacing factor 1	+ 4,2
Adipose differentiation related protein	+ 4,2
Structural maintenance of chromosomes 4	+ 4,0
Early growth response 1	+ 4,0
Splicing factor 3b, subunit 1	+ 4,0
Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	+ 3,8
AXIN1 up-regulated 1	+ 3,6
Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6	+ 3,6
Huntingtin	+ 3,5
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta)	+ 3,4
Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	+ 3,4
Nucleolar protein 14	+ 3,4
Casitas B-lineage lymphoma	+ 3,3
Inositol hexaphosphate kinase 2	+ 3,3
Kinesin family member 5B	+ 3,1
Cold shock domain containing E1, RNA binding	+ 3,1
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta)	+ 2,9
Metal response element binding transcription factor 2	+ 2,8
Mediator complex subunit 13	+ 2,8
Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)	+ 2,7
Deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 2	+ 2,7
Attractin like 1	+ 2,7
Nuclear receptor co-repressor 1	+ 2,6
SH3 domain containing ring finger 3	+ 2,6
Pleckstrin homology domain interacting protein	+ 2,6
Kruppel-like factor 4 (gut)	+ 2,6
Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	+ 2,6
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	+ 2,5
Heme oxygenase (decycling) 1	+ 2,5
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta)	+ 2,5
Ornithine decarboxylase, structural 1	+ 2,5
GTPase activating protein and VPS9 domains 1	+ 2,5
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	+ 2,4
Dyskeratosis congenita 1, dyskerin homolog (human)	+ 2,4
Growth arrest-specific 2 like 3	+ 2,4
Zinc finger, AN1-type domain 2A	+ 2,3
Josephin domain containing 3	+ 2,2

Septin 7	+ 2,2
G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	+ 2,2
Zinc finger CCCH type containing 6	+ 2,2
Preimplantation protein 4	+ 2,2
Arylacetamide deacetylase-like 1	+ 2,1
Transformed mouse 3T3 cell double minute 2	+ 2,1
Preimplantation protein 4	+ 2,1
SUMO/sentrin specific peptidase 6	+ 2,1
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit A	+ 2,0
Glycoprotein 49 A	+ 2,0
Tousled-like kinase 2 (Arabidopsis)	+ 2,0
Transformed mouse 3T3 cell double minute 4	+ 2,0
Cytochrome c oxidase, subunit VIIa 2	- 2,0
Defender against cell death 1	- 2,0
Carbohydrate sulfotransferase 12	- 2,0
Pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein	- 2,0
Aurora kinase A	- 2,0
UBX domain containing 6	- 2,1
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	- 2,1
Glucuronidase, beta	- 2,1
Mannosidase, alpha, class 1C, member 1	- 2,1
Anaphase promoting complex subunit 7	- 2,2
Pituitary tumor-transforming 1	- 2,2
Xylosyltransferase II	- 2,2
Pyrroline-5-carboxylate reductase-like	- 2,2
Phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)	- 2,2
Coiled-coil domain containing 115	- 2,3
Calsyntenin 1	- 2,3
Midasin homolog (yeast)	- 2,4
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11	- 2,4
Mitochondrial ribosomal protein L18	- 2,5
Deoxythymidylate kinase	- 2,5
Karyopherin (importin) alpha 2	- 2,5
SAC3 domain containing 1	- 2,5
Cartilage associated protein	- 2,5
Stearoyl-coenzyme A desaturase 3	- 2,5

Retinoblastoma binding protein 5	- 2,6
Olfactomedin 1	- 2,7
Glucocorticoid receptor DNA binding factor 1	- 2,7
Mitogen-activated protein kinase kinase 6	- 2,7
Replication factor C (activator 1) 1	- 2,7
Fc receptor, IgG, high affinity I	- 2,8
Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	- 2,9
Polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	- 3,0
Ets variant gene 5	- 3,1
Syntrophin, acidic 1	- 3,1
UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (yeast)	- 3,2
Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1	- 3,2
Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2)	- 3,2
F-box and leucine-rich repeat protein 5	- 3,2
Reticulocalbin 2	- 3,3
Ankyrin repeat domain 6	- 3,3
TRM5 tRNA methyltransferase 5 homolog (S. cerevisiae)	- 3,5
Tyrosine kinase, non-receptor, 2	- 3,5
Trafficking protein particle complex 1	- 3,7
Golgi integral membrane protein 4	- 3,8
Dual specificity phosphatase 7	- 4,4
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	- 4,8
Cysteine-rich protein 1 (intestinal)	- 5,4

Tab. 4: Transkriptomuntersuchung mittels Microarray unter Verwendung von DMSO als Lösungsmittel

Nach Stimulation mit MEHP unter Verwendung von DMSO als Lösungsmittel, RNA-Aufreinigung und reverser Transkription wird eine vergleichende Genexpressionsanalyse durchgeführt. Als Signifikanzniveau einer erhöhten Expression wird der Faktor 2,0 festgelegt.

3.2.2.2 Transkriptomuntersuchung mittels Microarray ohne Verwendung von DMSO als Lösungsmittel

Um analysieren zu können, ob die Messergebnisse durch eine Beeinflussung der Reaktivität der Zellen durch DMSO verfälscht werden, wird in einem weiteren Stimulationsversuch auf die Verwendung von DMSO verzichtet und MEHP direkt in RPMI-Medium gelöst. Die Zellen werden für sechs Stunden mit MEHP stimuliert, sodass die MEHP-Konzentration im Medium wie auch bei der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel bei 1000 µmol/L liegt. Als Kontrolle dient eine lediglich mit RPMI behandelte Probe. Alle Versuchsansätze sowie die Auswertung mittels DNA-Microarray erfolgen ebenfalls in Doppelbestimmung. In der folgenden Abbildung sind die Änderungen der Genexpression aufgeführt.

Gen-Name	Fold change
Adipose differentiation related protein	+ 8,2
Preimplantation protein 4	+ 6,0
Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	+ 5,8
Preimplantation protein 4	+ 5,3
Tribbles homolog 3 (Drosophila)	+ 4,3
Interferon-related developmental regulator 1	+ 4,1
Sequestosome 1	+ 4,0
Solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	+ 3,9
Coiled-coil domain containing 69	+ 3,8
Transformed mouse 3T3 cell double minute 4	+ 3,5
Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	+ 3,4
CDC-like kinase 1	+ 3,2
Kinesin family member 5B	+ 3,0
Transformed mouse 3T3 cell double minute 2	+ 3,0
Casitas B-lineage lymphoma	+ 2,9
Mediator complex subunit 13	+ 2,9
Arylacetamide deacetylase-like 1	+ 2,8
Translocated promoter region	+ 2,8

Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	+ 2,8
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	+ 2,8
Myeloid differentiation primary response gene 116	+ 2,6
Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	+ 2,6
Huntingtin	+ 2,6
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	+ 2,6
Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)	+ 2,5
Remodeling and spacing factor 1	+ 2,5
Signal transducer and activator of transcription 3	+ 2,5
Pleckstrin homology domain interacting protein	+ 2,5
Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6	+ 2,5
Metallothionein 2	+ 2,4
Glycoprotein 49 A	+ 2,4
Structural maintenance of chromosomes 4	+ 2,4
Tousled-like kinase 2 (Arabidopsis)	+ 2,4
Ornithine decarboxylase, structural 1	+ 2,4
Dyskeratosis congenita 1, dyskerin homolog (human)	+ 2,4
Zinc finger, AN1-type domain 2A	+ 2,3
G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	+ 2,3
Growth arrest-specific 2 like 3	+ 2,3
Structural maintenance of chromosomes 4	+ 2,2
Metallothionein 2	+ 2,2
Serologically defined colon cancer antigen 1	+ 2,2
Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14	+ 2,1
AXIN1 up-regulated 1	+ 2,1
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta)	+ 2,1
Membrane-associated ring finger (C3HC4) 7	+ 2,1
Deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 2	+ 2,1
Peptidyl-prolyl isomerase G (cyclophilin G)	+ 2,1
Similar to Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein family member (pqn-75)	+ 2,1
Nucleolar protein 5	+ 2,1
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	+ 2,0
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit A	+ 2,0
Heme oxygenase (decycling) 1	+ 2,0
Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)	+ 2,0
SH3 domain containing ring finger 3	+ 2,0
Ubiquitin C	+ 2,0

Zinc finger CCCH type containing 11A	+ 2,0
Pellino 1	+ 2,0
Zinc finger CCCH type containing 6	+ 2,0
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta)	+ 2,0
Splicing factor 3b, subunit 1	+ 2,0
Kruppel-like factor 4 (gut)	+ 2,0
Transmembrane protein 176B	- 2,0
Peptidylprolyl isomerase (cyclophilin) like 5	- 2,0
UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (yeast)	- 2,0
Carbohydrate sulfotransferase 12	- 2,0
Aurora kinase A	- 2,0
UBX domain containing 6	- 2,1
Trafficking protein particle complex 1	- 2,1
Defender against cell death 1	- 2,1
Phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)	- 2,2
Pyrophosphatase (inorganic) 2	- 2,2
Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2)	- 2,2
Replication protein A3	- 2,2
Cartilage associated protein	- 2,2
F-box and leucine-rich repeat protein 5	- 2,2
Stearoyl-coenzyme A desaturase 3	- 2,2
Zinc finger protein 710	- 2,3
Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 19	- 2,3
Pituitary tumor-transforming 1	- 2,3
Fc receptor, IgG, high affinity I	- 2,3
Ets variant gene 5	- 2,4
Mitogen-activated protein kinase kinase 6	- 2,4
Reticulocalbin 2	- 2,5
Flap structure specific endonuclease 1	- 2,5
Cyclin F	- 2,5
Pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein	- 2,6
Cytochrome c oxidase, subunit VIIa 2	- 2,7
Coiled-coil domain containing 115	- 2,7
Cyclin D3	- 2,7
SAFB-like, transcription modulator	- 2,7
Ribonucleotide reductase M2	- 2,7
Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	- 2,8

Replication factor C (activator 1) 1	- 2,9
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	- 3,0
Midasin homolog (yeast)	- 3,1
Deoxythymidylate kinase	- 3,1
Olfactomedin 1	- 3,2
Retinoblastoma binding protein 5	- 3,2
Golgi integral membrane protein 4	- 3,2
Anaphase promoting complex subunit 7	- 3,3
Dual specificity phosphatase 7	- 3,3
Syntrophin, acidic 1	- 3,3
Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1	- 3,4
Ankyrin repeat domain 6	- 3,4
TRM5 tRNA methyltransferase 5 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	- 3,6
Tyrosine kinase, non-receptor, 2	- 3,6
Mitochondrial ribosomal protein L18	- 4,1
Cysteine-rich protein 1 (intestinal)	- 4,1

Tab. 5: Transkriptomuntersuchung mittels Microarray ohne Verwendung von DMSO als Lösungsmittel

Nach Stimulation mit MEHP ohne Verwendung von DMSO als Lösungsmittel, RNA-Aufreinigung und reverser Transkription wird eine vergleichende Genexpressionsanalyse durchgeführt. Als Signifikanzniveau einer erhöhten Expression wird der Faktor 2,0 festgelegt.

3.2.3 Validierung der durch Microarray ermittelten Änderung der Genexpression für Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) und Chemokine Receptor 4 (CXCR 4) nach Behandlung mit MEHP ohne DMSO mittels real time PCR

Bei der Analyse der Ergebnisse, die die Transkriptomanalyse mittels DNA-Microarray ergeben haben, fällt auf, dass eine Vielzahl an Genen durch die Exposition mit MEHP reguliert wird. Exemplarisch wird die Regulation zweier Gene mittels real time PCR untersucht, um die Ergebnisse der Microarray-Analyse zu validieren. Für die Analyse wird zum einen das Adipose Differentiation Related Protein (ADRP), ein zentrales Protein des Fettstoffwechsels sowie zum anderen der Chemokin Rezeptor 4 (CXCR 4), ein für die Hämatopoese wichtiger Zytokinrezeptor, ausgewählt. Die Bedeutung der entsprechenden Regulation beider Gene wird im Diskussionsteil ausführlich erörtert. Es wird RNA aus dem gleichen Stimulationsversuch, aus dem die RNA für die Array-Analyse gewonnen wurde, aufgereinigt, amplifiziert und mittels Light Cycler analysiert.

3.2.3.1 Validierung der durch Microarray ermittelten Änderung der Genexpression für das Adipose Differentiation Related Protein (ADRP)

Im Rahmen der Analyse mittels real time PCR wird die Regulation von ADRP bestätigt. Es zeigt sich eine 8,6-fache Up-Regulation der Genexpression in Versuchsansatz 1 und eine 8,8-fache Up-Regulation in Versuchsansatz 2.

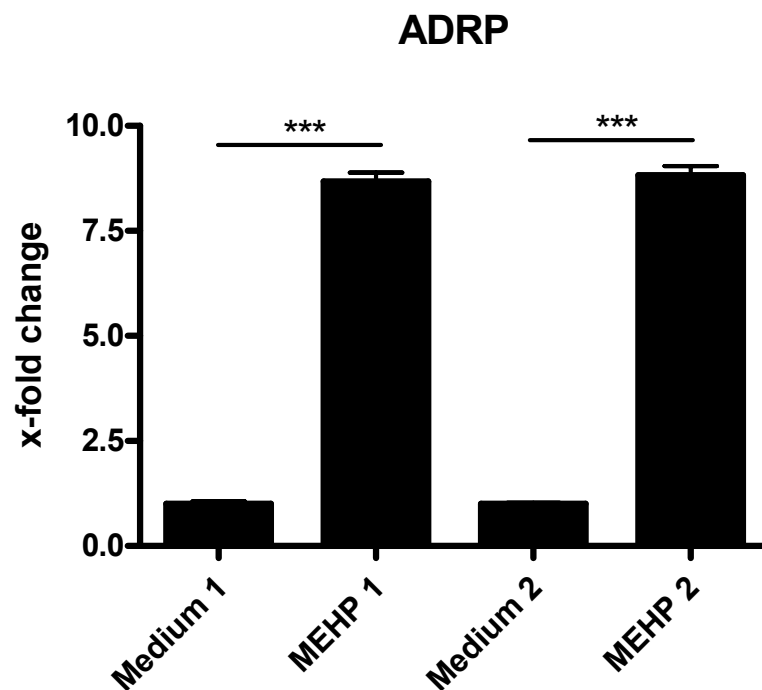


Abb. 18: Validierung der Ergebnisse der Array-Analyse der Genexpressionsregulierung für ADRP in einer J774-Zelllinie nach Exposition mit MEHP

Es wird die Regulation der Genexpression des Genes für das Adipose Differentiation Related Protein (ADRP), welches sich in der Array-Analyse als signifikant reguliert gezeigt hatte, mittels real time PCR gemessen, wobei eine dreifache Messung durchgeführt wird.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.2.3.2 Validierung der durch Microarray ermittelten Änderung der Genexpression des Chemokine Receptor 4 (CXCR 4)

Im Rahmen der Analyse mittels real time PCR wird die Regulation von CXCR 4 bestätigt. Für CXCR4 ergibt sich eine 4,4-fache Down-Regulation der Genexpression in Versuchsansatz 1 und eine 38,8-fache Down-Regulation in Versuchsansatz 2.

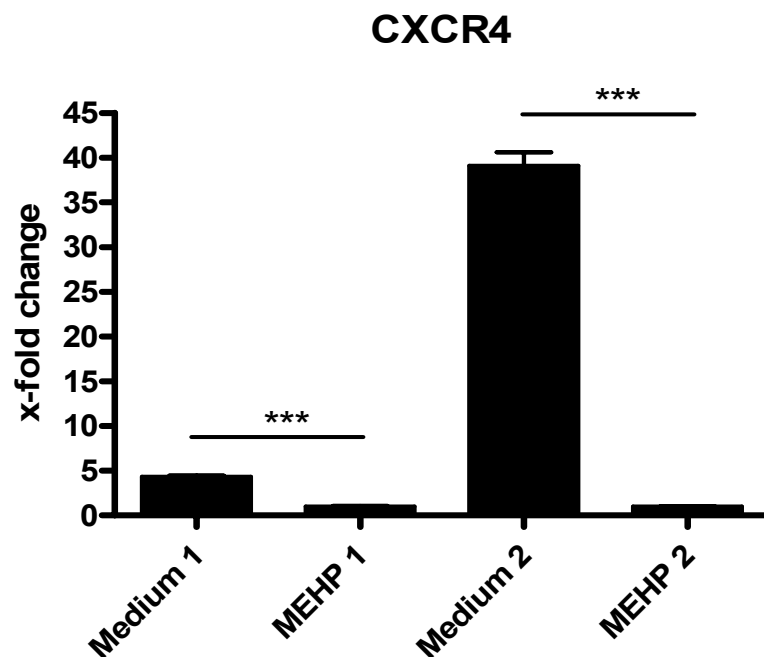


Abb. 19: Validierung der Ergebnisse der Array-Analyse der Genexpressionsregulierung für CXCR4 in einer J774-Zelllinie nach Exposition mit MEHP

Es wird die Regulation der Genexpression des Genes für den Chemokin Receptor 4 (CXCR4), welches sich in der Array-Analyse als signifikant reguliert gezeigt hat, mittels real time PCR gemessen, wobei eine dreifache Messung durchgeführt wird.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.2.4 Untersuchung der Beeinflussung der Expression von Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptoren in J774-Zellen nach Exposition mit MEHP ohne DMSO

MEHP ist schon lange als Ligand für die Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptoren (PPARs) bekannt. In diesem Zusammenhang wurden vor allem Hepatozyten untersucht. Um zu untersuchen, ob die Exposition mit MEHP auch in einer J774-Zelllinie zu einer Regulierung der Genexpression der PPARs führt, wird die Genexpression von PPAR α , PPAR γ und PPAR δ mittels real time PCR gemessen. Hierzu werden Proben der gleichen RNA verwendet, die auch zur Transkriptomanalyse des Versuchsansatzes mit einer J774-Zelllinie ohne DMSO als Lösungsmittel verwendet wurden.

3.2.4.1 Beeinflussung der Expression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors γ in J774-Zellen nach Exposition mit MEHP

Die Analyse mittels real time PCR ergibt für PPAR γ eine 8,6-fache Up-Regulation der Genexpression in Versuchsansatz 1 und eine 3,2-fache Up-Regulation in Versuchsansatz 2.

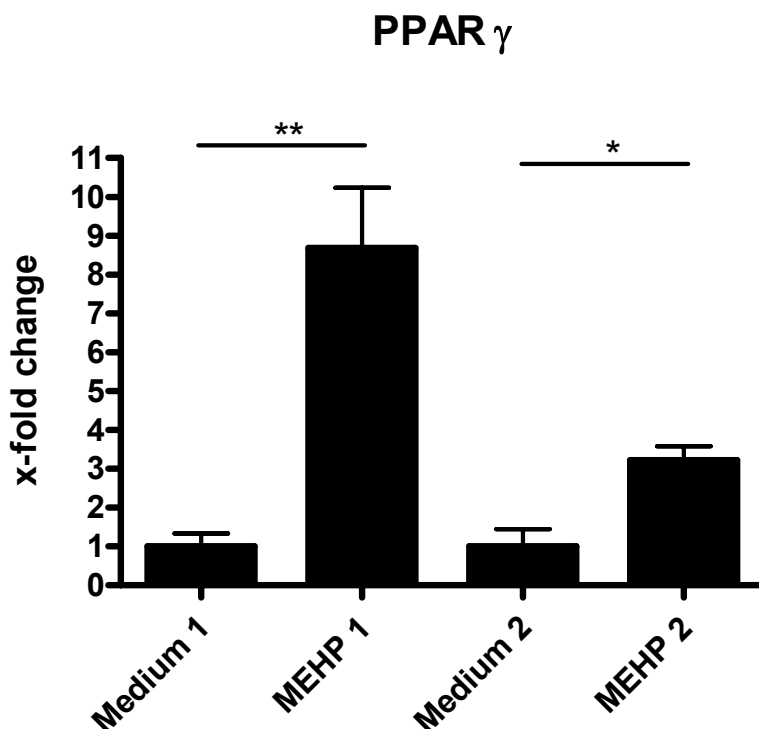


Abb. 20: Regulation der Expression von Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptor γ in J774-Zellen nach Exposition mit MEHP

Es wird die Regulation der Genexpression des Genes für den Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptor γ mittels real time PCR gemessen, wobei eine dreifache Messung durchgeführt wird.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.2.4.2 Beeinflussung der Expression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors δ in J774-Zellen nach Exposition mit MEHP

Nach Exposition der J774-Zellen mit MEHP zeigen sich für PPAR δ keine signifikanten Unterschiede der Genexpression zwischen stimulierter Probe und Kontrollprobe.

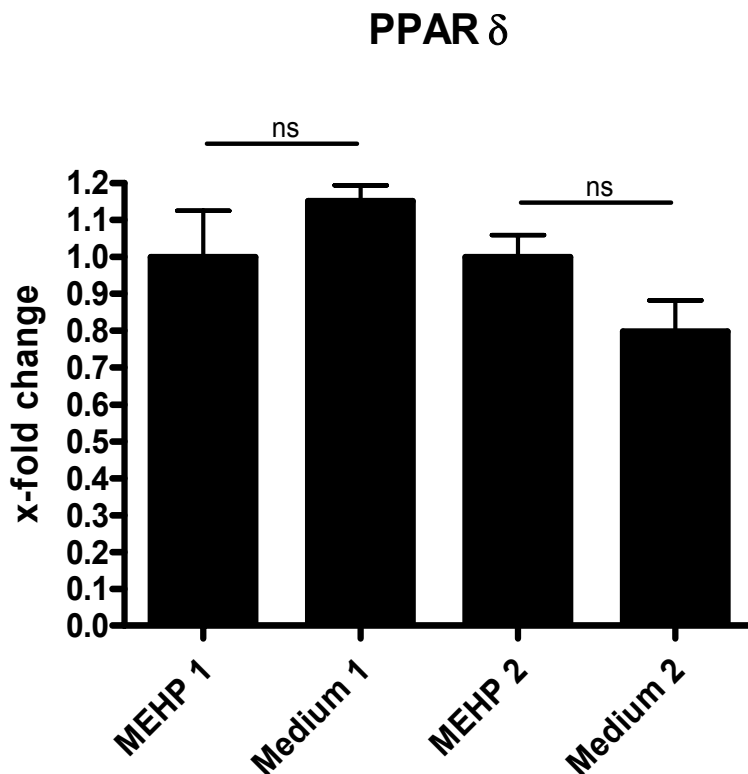


Abb. 21: Regulation der Expression von Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptor δ in J774-Zellen nach Exposition mit MEHP

Es wird die Regulation der Genexpression des Genes für den Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptor δ mittels real time PCR gemessen, wobei eine dreifache Messung durchgeführt wird. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.2.4.3 Beeinflussung der Expression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors α in J774-Zellen nach Exposition mit MEHP

Die RNA-Konzentrationen für PPAR α in den Zellen der analysierten J774-Zelllinie beider Gruppen ist so gering, dass sich keine reproduzierbaren, validen Messergebnisse erzielen lassen.

3.3 Beeinflussung der Genexpression in murinem Lungenparenchym durch MEHP

Zur Klärung der Frage, ob eine aerosole Exposition mit MEHP eine Auswirkung auf die Genexpression in murinem Lungenparenchym hat, mussten die Lungen der Versuchstiere lavagiert und perfundiert werden, um eine leukozytäre Kontamination aus dem broncho-alveolären Lumen oder dem Gefäßsystem zu vermeiden. Es werden aus jeder Gruppe drei Versuchstiere verwendet, die Messung der jeweiligen Konzentration an cDNA mittels Lightcycler erfolgt als Doppelbestimmung.

3.3.1 Regulierung der Genexpression von Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) und Chemokine Receptor 4 (CXCR 4) in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP

Für ADRP und CXCR4 zeigen sich im Rahmen der Expressionsanalyse mittels Real Time PCR keine signifikanten Unterschiede in PBS- und MEHP-Gruppe.

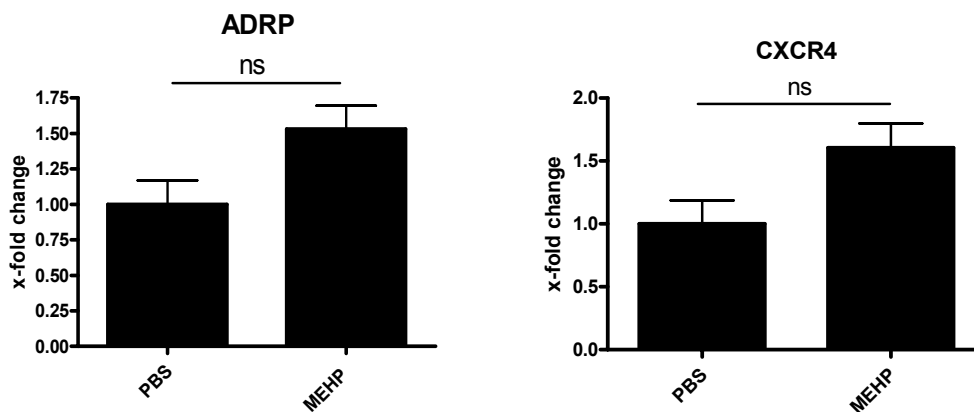


Abb. 22: Regulierung der Genexpression von Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) und Chemokine Receptor 4 (CXCR 4) in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP

Weibliche BALB/c Mäuse werden, wie in Material und Methoden beschrieben, über 39 Tage einer aerosolen Exposition mit MEHP ausgesetzt. Nach entsprechender Aufarbeitung der Lungen der Versuchstiere wird die Regulation der Genexpression von Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) und Chemokine Receptor 4 (CXCR 4) gemessen (n=3 für jede Gruppe, jeweils als dreifache Messung).

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

3.3.2 Regulierung der Genexpression von Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptoren in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP

Für viele verschiedene Gewebe ist die Regulation der PPARs durch den Liganden MEHP untersucht. Um einen regulativen Einfluß auf murines Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP zu untersuchen, wird mittels real time PCR die Genexpression von PPAR α , PPAR γ und PPAR δ im Lungengewebe der Versuchstiere gemessen.

3.3.2.1 Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors δ in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP

Die beschriebene aerosole Exposition der Versuchstiere mit MEHP führt zu einer 1,33-fachen Up-Regulation der Genexpression für PPAR δ im Lungenparenchym der untersuchten Versuchstiere.

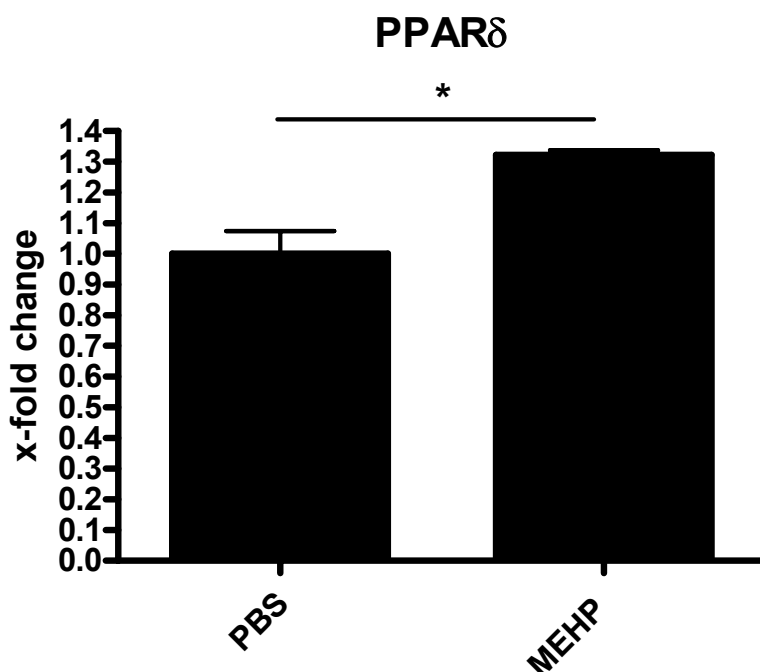


Abb. 23: Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors δ in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP

Weibliche BALB/c Mäuse werden wie in Material und Methoden beschrieben über 39 Tage einer aerosolen Exposition mit MEHP ausgesetzt. Nach entsprechender Aufarbeitung der Lungen der Versuchstiere wird die Regulation der Genexpression von PPAR δ gemessen (n=3 für jede Gruppe, jeweils als dreifache Messung).

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

3.3.2.2 Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptor γ in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP

Für PPAR γ zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der Genexpression in PBS- und MEHP-Gruppe.

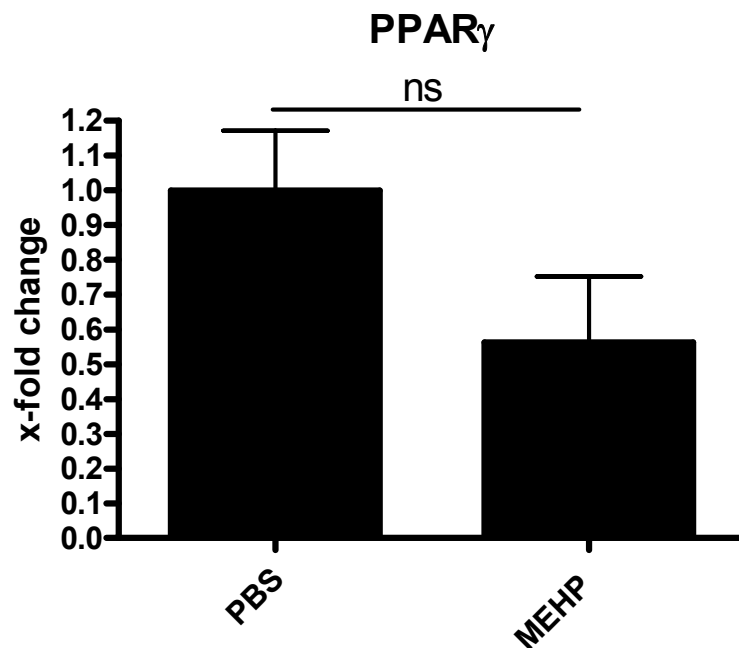


Abb. 24: Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors γ in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP

Weibliche BALB/c Mäuse werden wie in Material und Methoden beschrieben über 39 Tage einer aerosolen Exposition mit MEHP ausgesetzt. Nach entsprechender Aufarbeitung der Lungen der Versuchstiere wird die Regulation der Genexpression von PPAR γ gemessen (n=3 für jede Gruppe, jeweils als dreifache Messung).

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

3.3.2.3 Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors α in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP

Für PPAR α zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der Genexpression in PBS- und MEHP-Gruppe.

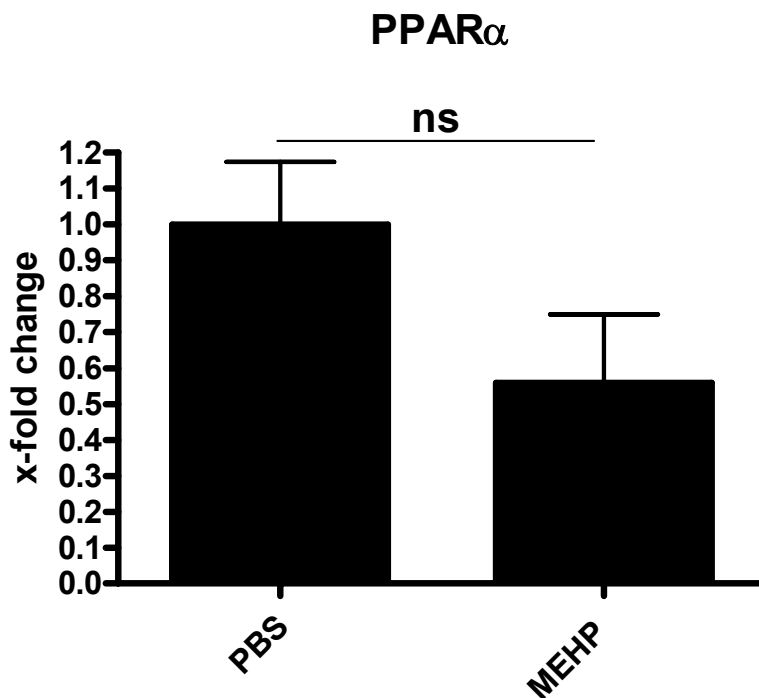


Abb. 25: Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors α in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP

Weibliche BALB/c Mäuse werden wie in Material und Methoden beschrieben über 39 Tage einer aerosolen Exposition mit MEHP ausgesetzt. Nach entsprechender Aufarbeitung der Lungen der Versuchstiere wird die Regulation der Genexpression von PPAR α gemessen (n=3 für jede Gruppe, jeweils als dreifache Messung).

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

3.4 Untersuchung der Beeinflussung der Genexpression in murinen Alveolarmakrophagen durch aerosole Exposition mit MEHP

Die Transkriptomanalyse mittels DNA-Microarrays einer J774-Zelllinie nach Exposition mit MEHP ergab eine signifikante Up-Regulation für ADRP und eine signifikante Down-Regulation für CXCR4 (s. 3.3.2). Um zu untersuchen, ob sich diese Ergebnisse auch in den im Tierversuch nach Exposition mit MEHP gewonnen Alveolarmakrophagen bestätigen lassen, wird die Genexpression mittels real time PCR analysiert. Hierzu werden nach zervikaler Dislokation die Lungen der Versuchstiere wie in Material und Methoden lavagiert, aus den isolierten Makrophagen RNA gewonnen, aufgereinigt, amplifiziert und mittels Light Cycler analysiert.

3.4.1 Regulierung der Genexpression des Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) durch aerosole Exposition mit MEHP in murinen Alveolarmakrophagen

Nach beschriebener aerosoler Exposition der Versuchstiere mit MEHP zeigen sich im Gegensatz zu den Ergebnissen der Microarray-Analyse keine signifikanten Unterschiede der Regulierung der Genexpression für ADRP in PBS- und MEHP-Gruppe.

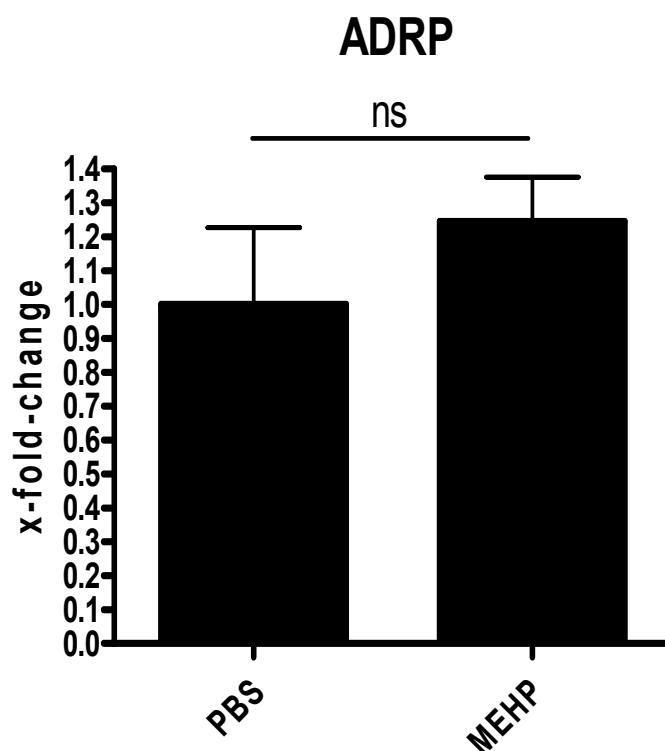


Abb. 26: Regulierung der Genexpression des Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) in murinen Alveolarmakrophagen durch aerosole Exposition mit MEHP

Weibliche BALB/c Mäuse werden wie in Material und Methoden besprochen über 39 Tage einer aerosolen Exposition mit MEHP ausgesetzt (n=4 in der PBS-Gruppe, n=8 in der MEHP 500 µg/ml -Gruppe). Nach Aufarbeitung der aus der BAL isolierten Makrophagen wird die Regulation der Genexpression von ADRP gemessen, wobei eine Dreifachmessung durchgeführt wird. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

3.4.2 Regulierung der Genexpression des Chemokinreceptors 4 (CXCR4) durch aerosole Exposition mit MEHP in murinen Alveolarmakrophagen

Die beschriebene aerosole Exposition der Versuchstiere mit MEHP führt im Gegensatz zu den Ergebnissen der Microarray-Analyse zu einer 2,2-fachen Up-Regulation der Genexpression für CXCR4.

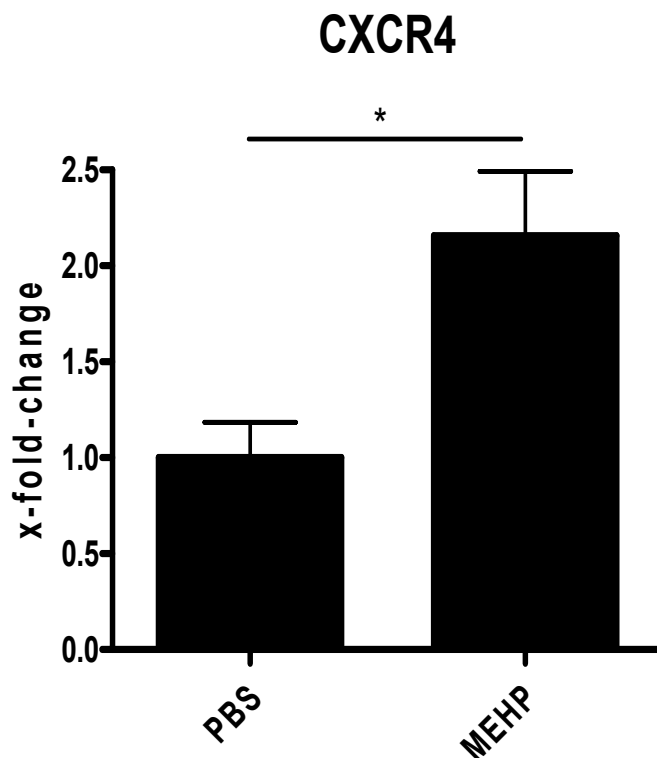


Abb. 27: Regulierung der Genexpression des Chemokine Receptor 4 (CXCR 4) in murinen Alveolarmakrophagen durch aerosole Exposition mit MEHP

Weibliche BALB/c Mäuse werden wie in Material und Methoden besprochen über 39 Tage einer aerosolen Exposition mit MEHP ausgesetzt (n=4 in der PBS-Gruppe, n=8 in der MEHP 500 µg/ml -Gruppe). Nach Aufarbeitung der aus der BAL isolierten Makrophagen wird die Regulation der Genexpression von CXCR4 gemessen, wobei eine Dreifachmessung durchgeführt wird. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

3.5 Regulierung der Genexpression von Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptoren (PPARs) durch aerosole Exposition mit MEHP in murinen Alveolarmakrophagen

Nach Exposition einer J774-Zelllinie mit MEHP zeigte sich lediglich für PPAR γ eine signifikante Regulation der Genexpression. Um zu untersuchen, ob die aerosole Exposition der Versuchstiere zu einer Regulierung der Genexpression der PPARs in murinen Alveolarmakrophagen führt, wird die Genexpression von PPAR α , PPAR γ und PPAR δ mittels real time PCR gemessen.

3.5.1 Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors δ durch aerosole Exposition mit MEHP in murinen Alveolarmakrophagen

Die beschriebene aerosole Exposition der Versuchstiere mit MEHP führt zu einer 5,9-fachen Up-Regulation der Genexpression für PPAR δ in den untersuchten Alveolarmakrophagen.

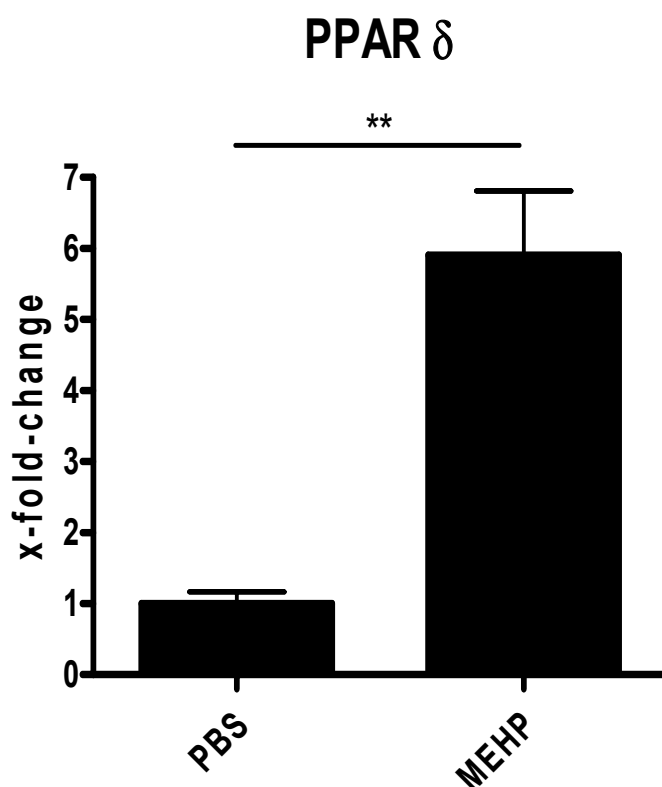


Abb. 28: Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors δ in murinem Alveolarmakrophagen durch aerosole Exposition mit MEHP

Weibliche BALB/c Mäuse werden wie in Material und Methoden besprochen über 39 Tage einer aerosolen Exposition mit MEHP ausgesetzt (n=4 in der PBS-Gruppe, n=8 in der MEHP 500 $\mu\text{g/ml}$ -Gruppe). Nach Aufarbeitung der aus der BAL isolierten Makrophagen wird die Regulation der Genexpression von PPAR δ gemessen, wobei eine Dreifachmessung durchgeführt wird. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.5.2 Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors γ durch aerosole Exposition mit MEHP in murinen Alveolarmakrophagen

Nach beschriebener aerosoler Exposition der Versuchstiere mit MEHP zeigen sich im Rahmen der Expressionsanalyse keine signifikanten Unterschiede in PBS- und MEHP-Gruppe für PPAR γ .

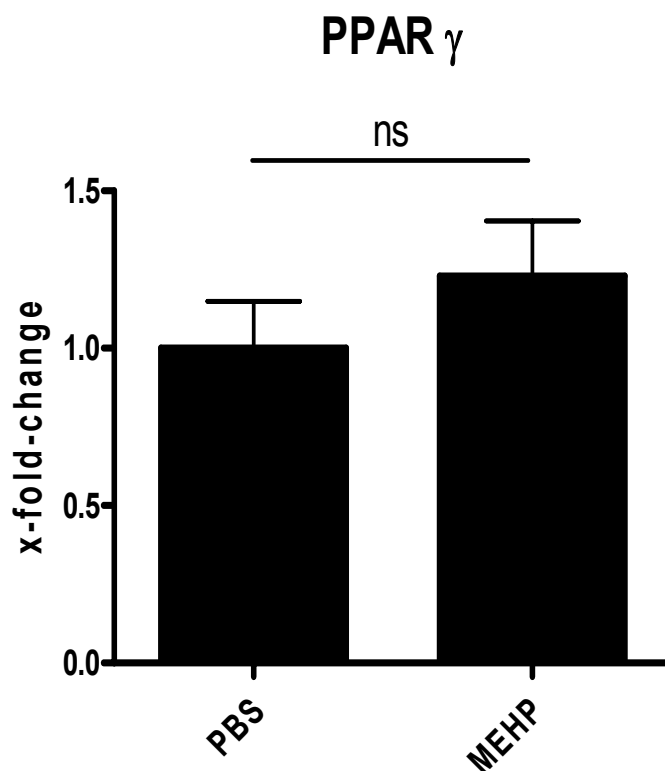


Abb. 29: Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors γ in murinem Alveolarmakrophagen durch aerosole Exposition mit MEHP

Weibliche BALB/c Mäuse werden wie in Material und Methoden besprochen über 39 Tage einer aerosolen Exposition mit MEHP ausgesetzt (n=4 in der PBS-Gruppe, n=8 in der MEHP 500 $\mu\text{g/ml}$ -Gruppe). Nach Aufarbeitung der aus der BAL isolierten Makrophagen wird die Regulation der Genexpression von PPAR γ gemessen, wobei eine Dreifachmessung durchgeführt wird. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

3.5.3 Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors α durch aerosole Exposition mit MEHP in murinen Alveolarmakrophagen

Nach beschriebener aerosoler Exposition der Versuchstiere mit MEHP sind die cDNA-Konzentrationen für PPAR α in den analysierten Alveolarmakrophagen beider Gruppen so gering, dass sich keine reproduzierbaren, validen Messergebnisse erzielen lassen.

3.6 Primerdesign

Für das Primerdesign wird Primer Picker, eine im Internet frei verfügbare Software, verwendet [47]. Es wird darauf geachtet, dass die Länge der Primer zwischen 18 und 20 Nukleotiden liegt, da die Primerspezifität mit abnehmender Länge sinkt, jedoch ab einer Primerlänge von 24 Nucleotiden keine Erhöhung der Spezifität mehr erzielt werden kann [74]. Des Weiteren wird beachtet, dass der GC-Gehalt der Primer zwischen 40 % und 60 % liegt, die Basen gleichmäßig verteilt sind und die Schmelztemperatur, bei der 50 % der Primer-cDNA-Hybride als Einzelstränge vorliegen, zwischen 55 °C und 65 °C liegt.

3.6.1 Primer PPARy

Für die Bestimmung des PPAR γ wird ein spezifisches Primerpaar mit der Sequenz 5'- gat gga aga cca ctc gca tt -3' (PPAR γ -a1) und 5'- caa gag ctg acc caa tgg tt -3' (PPAR γ -s1) ausgewählt. Der a1-Primer besitzt einen gc-Gehalt von 50 % und eine Schmelztemperatur von 60,08 °C, der s1-Primer einen gc-Gehalt von 50 % und eine Schmelztemperatur von 60,11 °C. Die Zielsequenz dieses Primerpaares besitzt eine Länge von 115 Basenpaaren.

181 gtggacctctccgtgatggaagaccactcgattccttgacatcaagccctttaccaca
>>>>>>>>>>>>>>>>

241 gttgatttctccagcatttctgctccacactatgaagacattccattcacaaagagctgac
<<<<<<<<<<<<<<<<

ccaatggttgctgattacaaatatgacctgaagctccaagaataccaaagtgcgatcaaa
<<<<<<<<

Abb. 30: Primer PPAR γ Mus Musculus

3.6.2 Primer PPAR α

Für die Bestimmung des PPAR α wird ein spezifisches Primerpaar mit der Sequenz 5'- tgc aaa ctt gga ctt gaa cg -3' (PPAR α -a1) und 5'- aca aag acg gga tgc tga tc -3' (PPAR α -s1) ausgewählt. Der a1-Primer besitzt einen gc-Gehalt von 45 % und eine Schmelztemperatur von 59,88 °C, der s1-Primer einen gc-Gehalt von 50 % und eine Schmelztemperatur von 60,08 °C. Die Zielsequenz dieses Primerpaares besitzt eine Länge von 106 Basenpaaren.

[illegible]

Abb. 31: Primer PPAR α Mus Musculus

3.6.3 Primer PPAR δ

Für die Bestimmung des PPAR δ wird ein spezifisches Primerpaar mit der Sequenz 5'- gaa act gct ggc tga aaa gg -3' (PPAR δ -a1) und 5'- atc agt cag ggg gat gac ag -3' (PPAR δ -s1) ausgewählt. Der a1-Primer besitzt einen gc-Gehalt von 55 % und eine Schmelztemperatur von 59,99 °C, der s1-Primer einen gc-Gehalt von 50 % und eine Schmelztemperatur von 59,93 °C. Die Zielsequenz dieses Primerpaares besitzt eine Länge von 133 Basenpaaren.


```

2221  aggagatgaccttccagatgtcccctccagatgcggtccaacggccccaactgaagggaa
                                           >>>>>>>>
2281  gggggtagaggcaggccggaaggagcagcggcaacattaggtcccagggtcagaagctag
      >>>>>>>>
2341  acagcgagtgggcaggccctccatcagcaccctcctctaccctgttagcagcatccagac
                                           <<<<<<<<<<<<
2401  tggcagatcccagtaccaggaactggaccatagctgttctttcttctcctgggagatgct
      <<

```

Abb. 32: Primer PPAR δ Mus Musculus

3.6.4 Primer CXCR4

Für die Bestimmung des CXCR4 wird ein spezifisches Primerpaar mit der Sequenz 5'- gaa act gct ggc tga aaa gg -3' (CXCR4 - a1) und 5'- atc agt cag ggg gat gac ag -3' (CXCR4 - s1) ausgewählt. Der a1-Primer besitzt einen gc-Gehalt von 55 % und eine Schmelztemperatur von 60,07 °C, der s1-Primer einen gc-Gehalt von 55 % und eine Schmelztemperatur von 59,98 °C. Die Zielsequenz dieses Primerpaares besitzt eine Länge von 102 Basenpaaren.

```

541  tccacgccaccaacagtcaaaggccaaggaaactgctggctgaaaaggcagtctatgtgg
                                           >>>>>>>>>>>>>>>>
601  gcgtctggatcccagccctcctcctgactatacctgacttcattcttgcgacgtcagcc
661  agggggacatcagtcagggggatgacagggtacatctgtgaccgcctttaccccgatagcc
      <<<<<<<<<<<<<<<<<

```

Abb. 33: Primer CXCR4 Mus Musculus

4 Diskussion

Im Rahmen der Notfallverordnung 1999/815/EG zur Untersuchung des Inverkehrbringens von bestimmten weichmacherhaltigen Babyartikeln (Beißspielzeug) wird auf die toxischen Effekte von DEHP und die daraus resultierende potentielle Gesundheitsgefährdung reagiert. 2002 fordert die Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin in einer Stellungnahme der Ernährungskommission einen Verzicht auf den Einsatz phthalathaltiger Infusionssysteme, da gerade bei der parenteralen Ernährung eines Frühgeborenen mit einer DEHP-Zufuhr zwischen 10 und 20 mg/Tag [77] zu rechnen ist. Die duldbare tägliche DEHP-Aufnahme (Tolerable Daily Intake, TDI) von 0,05 mg/kg kann so deutlich überschritten werden. Am 14. Dezember 2005 gab dann die Kommission der Europäischen Gemeinschaften mit der Richtlinie 2005/84/EG die 22. Verlängerung der Geltungsdauer der Entscheidung 1999/815/EG über Maßnahmen zur Untersagung des Inverkehrbringens von Spielzeug- und Babyartikeln bekannt, die dazu bestimmt sind, von Kindern unter drei Jahren in den Mund genommen zu werden und aus Weich-PVC bestehen, das einen oder mehrere der Stoffe Diisononyl Phthalat (DINP), Di(2-ethylhexyl) Phthalat (DEHP), Dibutyl Phthalat (DBP), Diisodecyl Phthalat (DIDP), Di(n-octyl) Phthalat (DNOP) oder Benzylbutyl Phthalat (BBP) enthält [106].

Roth et al. wiesen bereits 1988 in einer Arbeit zur Freisetzung von DEHP aus Beatmungsschläuchen und Beatmungstuben erhöhte DEHP-Spiegel in beatmeten Neonaten nach und einen Zusammenhang mit pulmonalen Komplikationen dieser Patienten [111]. Ein direkter Zusammenhang zwischen Phthalatexposition durch Beatmungssysteme und direkten morphologischen Veränderungen des Lungengewebes oder vermehrtes Auftreten von Erkrankungen der Lunge ist bisher nicht bewiesen. In der vorliegenden Arbeit werden die Auswirkungen auf die Lunge bei aerosoler Exposition mit dem Phthalat MEHP untersucht.

4.1 Aerosole MEHP-Exposition führt zu einem Anstieg der Alveolarmakrophagenzahl in murinem Lungengewebe

Eigene Untersuchungen im Vorfeld dieser Arbeit zeigten nach aerosoler MEHP-Exposition im Mausmodell in plethysmographischen Messungen eine signifikante Zunahme der metacholin-induzierten Atemwegshyperreagibilität. In weiterführenden Untersuchungen wurden die Versuchstiere bronchoalveolär lavagiert und die Zellen der Lavage identifiziert. Es zeigte sich eine Zunahme der Alveolarmakrophagenzahl von $2,5 \times 10^5$ auf über 10^6 Zellen/ml dieser Versuchstiere, wogegen eosinophile Granulozyten kaum nachgewiesen wurden. Auch Hansen et al. zeigten 2007 dass es bei aerosoler MEHP-Exposition von weiblichen Balb/c Mäusen zu einer deutlichen Zunahme der Makrophagen in der BAL kommt [37]. Ein zentraler Effekt nach aerosolöer Exposition mit MEHP im Mausmodell scheint also die alveoläre Besiedlung mit Makrophagen zu sein. Daher standen murine Alveolarmakrophagen im Fokus der weiteren mikro- und molekularbiologischen Untersuchungen.

4.2 Analyse der Einflusses von MEHP auf die Genexpression in J774-Zellen

4.2.1 In DMSO gelöstes MEHP führt zu einer Regulierung der Genexpression in J774-Zellen

In einem In-Vitro-Versuch wurden makrophagenähnliche, murine Zellen der Zelllinie J774 mit MEHP stimuliert. MEHP wurde hierbei so in DMSO gelöst und mit dem Zellkulturmedium versetzt, dass die DMSO-Konzentration im Zellkulturmedium bei 2 % und die resultierende MEHP-Konzentration im Zellkulturmedium bei 1000 $\mu\text{mol/L}$ liegt. Nach Aufreinigung der RNA und reverser Transkription wurde eine Analyse der Genexpression mittels vergleichender DNA-Gene-Arrays durchgeführt. Die Auswertung der Gene-Arrays misst hierbei die Regulierung der Genexpression einer mit in DMSO

gelöstem MEHP stimulierten Probe gegen eine mit DMSO stimulierten Kontrollprobe. In der anschließenden Analyse der Genexpression mittels Microarray zeigte sich ein deutlicher regulatorischer Effekt von in DMSO gelöstem MEHP auf verschiedene Gene. In DMSO gelöstes MEHP scheint einen breiten Einfluss auf die Expression verschiedenster Gene zu haben. Es zeigt sich ein regulatorischer Effekt auf verschiedene Gene, die an der Steuerung zentraler Stoffwechselwege, der intrazellulären Signaltransduktion oder der Transkription beteiligt sind (s. Tab. 4). So nimmt in DMSO gelöstes MEHP beispielsweise durch die Genregulation für die Stearoyl-Coenzyme A desaturase 2 (2,5-fold down) oder das adipose differentiation related protein (4,2-fold up) Einfluss auf den Fettstoffwechsel. Frühere Arbeiten haben bereits den Einfluss von in DMSO gelöstem MEHP auf den Fettstoffwechsel in Hepatozyten oder Trophoblasten beschrieben [90,137,141], doch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass auch in Alveolarmakrophagen der Fettstoffwechsel durch in DMSO gelöstes MEHP beeinflusst wird. Neben dem Fettstoffwechsel scheinen auch die intrazelluläre Signaltransduktion auf Ebene der Transkription sowie die im Zellkern stattfindenden Prozesse der Transkription, die Translation und deren Modifikation beeinflusst zu werden. Eine weitere Gruppe von signifikant regulierten Genen ist die Gruppe der Heat shock Proteine (HSP). Insbesondere die Heat shock Proteine HSP 1 alpha (8-fold up), HSP 1 beta (7,1-fold up) und HSP 105 (3,7-fold up) werden deutlich hochreguliert. In Situationen zellulären Stresses schützen Heat shock Proteine zelluläre Proteine durch Stabilisierung vor Denaturierung oder beschleunigen den Abbau beschädigter Proteine. Ausserdem erleichtern Heat shock Proteine die Aufnahme antigener Peptide durch antigen-präsentierende Zellen [56].

Eine Stimulation von J 774-Zellen mit in DMSO gelöstem MEHP führt also zu einer deutlichen Regulation vieler Gene. Welche Mechanismen dabei im Einzelnen eine Rolle spielen, sollte Anlass zukünftiger Untersuchungen sein.

4.2.2 Die Bedeutung von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel

Bei dem oben beschriebenen In-vitro-Versuch wurde MEHP aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit wie bisher üblich in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Das verwendete Lösungsmittel sollte idealerweise keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Gene haben, da die beobachteten Effekte sonst nicht auf den alleinigen Einfluss des MEHP zurückzuführen sind. Su et al. beschrieben bereits 2004 einen Einfluss von DMSO auf die Regulation der Genexpression in Hepatozyten [127]. Im oben beschriebenen Versuchsaufbau wird die Regulierung der Genexpression einer stimulierten Probe gegen eine unstimulierte Kontrollprobe gemessen. Effekte denen nur der Einfluss des DMSO zugrunde liegt, werden durch die vergleichende Analyse herausgerechnet. Ein möglicher kostimulatorischer Effekt von MEHP und DMSO kann so allerdings nicht ausgeschlossen werden. Um einen Einfluss von DMSO auf die Genexpression im In-vitro-Zellversuch auszuschließen, wurde in einem weiteren Versuchsansatz auf die Verwendung von DMSO verzichtet und MEHP direkt im Nährmedium gelöst. Durch die Verwendung von auf 37 °C erwärmtem Kulturmedium als Lösungsmedium, welches in beiden Versuchsansätzen mit fetalem Kälberserum versetzt wurde, gelang eine Lösung des MEHP ohne Verwendung von DMSO. Wie im In-vitro-Versuch unter Verwendung von DMSO als Lösungsmittel wurde nun eine Analyse der Genexpression mittels vergleichender DNA-Gene-Arrays durchgeführt.

4.2.3 MEHP führt zu einer Regulierung der Genexpression in J774-Zellen

Auch nach Verzicht auf das Lösungsmittel DMSO lässt sich eine Regulation der Expression einer Vielzahl von Genen nachweisen. Vergleicht man die Ergebnisse der Stimulationsversuche mit und ohne DMSO (s. 7.4), fallen Unterschiede auf. Der Vergleich der Ergebnisse zeigt, dass in beiden Stimulationsversuchen die Expression der gleichen Gene reguliert wird und die Richtung der Regulation, positiv oder negativ, ebenfalls identisch ist. Eine

Verwendung von DMSO als Lösungsmittel führt jedoch bei über 30 Genen zu einer stärkeren Regulation der Genexpression. Vor allem die Gene der Heat shock Proteine und einige für die Transkription wichtige Gene werden unter Verwendung von DMSO deutlich stärker reguliert.

Die Verwendung von DMSO bei Untersuchungen zur Regulation der Genexpression durch Phthalate sollte in Zukunft kritisch bewertet werden. Ein Verzicht auf DMSO als Lösungsmittel scheint notwendig zu sein, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Veränderung des Genexpressionsverhaltens in der Zellkultur zu vermeiden. Unter entsprechenden experimentellen Voraussetzungen kann, wie in dieser Arbeit für die eingesetzten Konzentrationen gezeigt, auf den Einsatz von DMSO als Lösungsmittel verzichtet werden.

4.3 Validierung der Ergebnisse der Microarray-Analysen mittels Real Time PCR

Bei der qualitativen Analyse der mittels Microarray gewonnen Daten zur Regulation der Genexpression in Zellen der Zelllinie J 774 durch MEHP rückten zwei Gene in den Fokus der weiteren Untersuchungen. Ein Einfluss von MEHP auf den Stoffwechsel und insbesondere auf den Fettstoffwechsel ist bereits vielfach beschrieben. Ergebnisse vorheriger Arbeiten zeigen den Einfluss von DEHP und seines Hauptmetaboliten MEHP auf die Regulation des Fettsäurestoffwechsels, den Fettsäuretransport und die peroxisomale β -Oxidation in Trophoblasten und Hepatozyten von Nagetieren [54,68,139-141]. Die Microarray-Analysen dieser Arbeit zeigen eine deutliche Regulation des Adipose differentiation related protein (ADRP), eines zentralen Protein des Fettstoffwechsels. Somit hat MEHP auch in murinen Makrophagen Einfluss auf den Fettstoffwechsel. Neben der Beeinflussung des Stoffwechsels nimmt MEHP auch einen Einfluss auf Steuerung der Immunabwehr. Die deutliche Down-Regulation eines Rezeptorproteins aus der Familie der Chemokinrezeptoren, des Chemokinrezeptors 4 (CXCR4), legt die Vermutung nahe, dass MEHP neben einer deutlichen Vermehrung der Zahl der

Alveolarmakrophagen in der BAL nach aerosoler Exposition auch einen Einfluss auf die direkte Einbindung von Makrophagen in die Immunantwort und deren Steuerung nach Exposition mit MEHP nimmt.

Eine Regulation dieser Gene nach Exposition mit MEHP ist bisher nicht beschrieben. Zur Validierung der Ergebnisse der Microarray-Analysen wurde, wie in 2.2.8 ff. beschrieben, die Genexpression dieser Gene quantitativ mittels Real Time PCR analysiert.

4.3.1 Eine Exposition mit MEHP führt zu einer Up-Regulation von ADRP in Zellen der Zelllinie J 774

In den Transkriptomuntersuchungen mittels Microarray zeigte sich eine 8,2-fache Up-Regulation für ADRP. Zur Validierung dieses Ergebnisses wurde die Genexpression von ADRP mittels real time PCR analysiert (2.2.8). Hierzu wurde RNA aus dem gleichen Stimulationsversuch, aus dem die RNA für die Microarray-Analyse gewonnen wurde, als Ausgangsprodukt verwendet, aufgereinigt, transkribiert und anschließend mittels real time PCR analysiert. Die quantitative Analyse mittels real time PCR bestätigte die Regulation von ADRP. Es zeigte sich eine 8,6-fache Up-Regulation ($p < 0,001$) der Genexpression in Versuchsansatz 1 und eine 8,8-fache Up-Regulation ($p < 0,001$) in Versuchsansatz 2.

Masuda et al. beschrieben 2006 ADRP als zentrales Protein, welches bei der Entwicklung von Schaumzellen aus Makrophagen eine Schlüsselrolle inne hat [87]. 2007 bestätigten Llorente-Cortés et al. diese Ergebnisse und beschrieben wie Masuda et al. Lipoproteine als Stimulus zu Expression von ADRP in Makrophagen [75]. Ein weiterer Stimulus für die Expression von ADRP durch Makrophagen und die damit verbundene Bildung von Schaumzellen aus Makrophagen scheint eine Minderversorgung mit Sauerstoff zu sein [10].

In der vorliegenden Arbeit lässt sich im In-vitro Versuch eine Steigerung der Genexpression von ADRP in murinen Makrophagen nach Exposition mit MEHP nachweisen. Unter Laborbedingungen ist also MEHP im Zellversuch ein Stimulus für die Steigerung der Genexpression von ADRP. Die genauen

Mechanismen, die bei dieser Regulation eine Rolle spielen, und die pathophysiologische Bedeutung sollten Anlass für weitere Untersuchungen sein.

4.3.2 Eine Exposition mit MEHP führt zu einer Down-Regulation von CXCR4 in Zellen der Zelllinie J 774

In den Transkriptomuntersuchungen mittels Microarray zeigte sich eine 2,8-fache Down-Regulation für CXCR4. Zur Validierung dieses Ergebnisses wurde die Genexpression von CXCR4 mittels real time PCR analysiert (2.2.8). Die quantitative Analyse mittels real time PCR bestätigte die Regulation von CXCR4. Es zeigte sich eine 4,4-fache Down-Regulation ($p < 0,001$) der Genexpression in Versuchsansatz 1 und eine 38,8-fache Down-Regulation ($p < 0,001$) in Versuchsansatz 2.

CXCR4, ein Rezeptorprotein aus der Familie der Chemokinrezeptoren, wird von dendritischen Zellen, Makrophagen und Lymphozyten, aber auch von Endothelzellen exprimiert. CXCR4 spielt eine Rolle als Kofaktor für den Eintritt des HI-Virus in die Zielzellen, ist involviert in die Migration von Krebszellen im Rahmen der Metastasierung und ist an der Steuerung und Vermittlung chronisch entzündlicher Erkrankungen wie Asthma oder Rheumathoider Arthritis beteiligt [18]. Ein Einfluss von MEHP auf die Genexpression von CXCR4 ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Lahousse et al. untersuchten 2006, ob MEHP als Ligand des CXCR4 in HeLa-zellen fungiert, konnten jedoch keine Änderung der Rezeptorphosphorylierung feststellen [65]. In Kenntnis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit muss von einem eher indirekten Einfluss einer MEHP-Exposition auf die Genexpression des CXCR4 ausgegangen werden. Welche pathophysiologischen Mechanismen dabei eine Rolle spielen und welcher direkte Effekt aus der Regulation resultiert, bleibt unklar.

4.3.3 Einfluss einer Exposition mit MEHP auf die Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptoren in Zellen der Zelllinie J 774

Bereits seit den 70er Jahren ist der Einfluss von DEHP und seiner Metabolite auf die Peroxisomenproliferation bekannt [66,91]. Ein Durchbruch im Verständnis dieses Effektes gelang erst nach Entdeckung des "Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR)" durch Issemann und Greene 1990 [53]. Initial galt hauptsächlich die Leber als Zielorgan der durch DEHP und seiner Metabolite vermitteln PPAR-abhängigen Effekte. In Hepatozyten bewirken DEHP und seine Metaboliten als Peroxisomenproliferatoren eine Hypertrophie und Hyperplasie der Hepatozyten [21] und über eine vermehrte Aktivität peroxisomaler Enzyme oxidativen Stress [16,103,104,108] und können so zur Induktion von hepatozellulären Karzinomen im Tierversuch führen [108,109,39]. Bald wurde jedoch klar, dass die verschiedenen Isoformen der PPARs unter anderem auch in Endothelzellen [51,85,86], Zellen der glatten Muskulatur [86,124], T-Lymphozyten [142], Adipozyten [11,13,50] und Makrophagen [57,83,84,86,93,107] exprimiert werden und Einfluss auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen nehmen.

Eine Detektion der Regulation der Genexpression der verschiedenen PPAR Isoformen PPAR α , PPAR γ und PPAR δ mittels DNA-Mikroarray im Rahmen der vorliegenden Arbeit war nicht möglich, da die Arrays keine den PPARs komplementären Gene-Spots enthielten. Um einen Einfluss einer MEHP-Exposition auf die PPAR-Genexpression zu analysieren wurde, eine Analyse mittels real Time PCR durchgeführt. Hierzu wurde RNA aus dem gleichen Stimulationsversuch, aus dem die RNA für die Microarray-Analyse gewonnen wurde, als Ausgangsprodukt verwendet. Es ergab sich für PPAR γ eine 8,6-fache Up-Regulation der Genexpression in Versuchsansatz 1 ($p < 0,01$) und eine 3,2-fache Up-Regulation in Versuchsansatz 2 ($p < 0,05$). Für PPAR δ konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen stimulierter Probe und Kontrollprobe festgestellt werden. Die RNA-Konzentrationen für PPAR α in den Zellen der analysierten J774-Zelllinie beider Gruppen waren so gering, dass sich keine reproduzierbaren, validen Messergebnisse für PPAR α erzielen ließen.

In verschiedenen Arbeiten ist auch MEHP als Hauptmetabolit des DEHP schon als Ligand des PPAR γ bekannt [8,50,81]. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine deutliche Up-Regulation der Genexpression für PPAR γ , womit dieser bereits vielfach für andere Zellarten beschriebene positiv-regulatorische Einfluss des MEHP auf die Genexpression des PPAR γ auch in murinen Makrophagen bestätigt ist. PPAR γ scheint auch in murinen Makrophagen eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung und Steuerung intrazellulärer Prozesse nach Exposition mit MEHP inne zu haben. Reddy beschrieb 2008 die zentrale Rolle des PPAR γ in Alveolarmakrophagen im Bezug auf die Modulation einer Immunantwort nach Inhalation von Pathogenen und Toxinen und kommt zu dem Schluss, dass PPAR γ essentiell für die Modulation und Limitierung einer Atemwegsinflammation ist [105]. Feige et al. zeigten 2007 ebenfalls, dass MEHP ein spezifischer Modulator des PPAR γ ist und beschrieben den Einfluss von MEHP auf den Fettstoffwechsel über die Modulation des PPAR γ [25]. PPAR δ lässt sich ebenfalls in murinen Makrophagen nachweisen, eine signifikante Regulation nach MEHP-Exposition lässt sich jedoch im Zellversuch nicht beobachten. 2007 beschrieben Minge et al. den Nachweis von PPAR α in murinen, ovariellen Makrophagen, attestierten jedoch in der gleichen Arbeit eine deutlich niedrigere Vorkommen in murinen, peritonealen Makrophagen [89]. Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Konzentration an RNA für PPAR α in murinen Makrophagen der Zelllinie J774 ist so niedrig, dass eine valide Messung der Regulation der Genexpression nicht möglich ist. Die Expression von PPAR α in murinen Makrophagen scheint also von der Spezialisierung der Zellen und der Umgebung in der die Makrophagen angesiedelt sind abzuhängen.

4.4 Änderungen in der Genexpression in Alveolarmakrophagen nach aerosoler Exposition mit MEHP von BALB/c-Mäusen

Die Stimulation muriner Makrophagen der Zelllinie J774 mit MEHP im Zellversuch unter Laborbedingungen und die anschließende Transkriptomuntersuchung mittels DNA-Microarray zeigten einen starken

Einfluss von MEHP auf die Genexpression. Eine Vielzahl von Genen wird nach dieser Stimulation signifikant reguliert und die Ergebnisse ausgewählter Gene erwiesen sich in der Analyse mittels real Time PCR als valide. In einem weiteren Schritt sollten die in vitro gewonnen Erkenntnisse über den Einfluss von MEHP auf die Regulierung der Genexpression in murinen Makrophagen im Tiermodell überprüft werden. Wie oben beschrieben führt eine aerosole Exposition mit MEHP in Balb/c-Mäusen zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl von Alveolarmakrophagen in der BAL der Versuchstiere (s. 3.1).

Die RNA der Makrophagen der BAL wurden nun aufgereinigt (s. 2.1.4), anschließend transkribiert (s. 2.2.6) und mittels real Time PCR analysiert (s. 2.2.8, 2.2.9), um zu untersuchen, ob sich die in vitro im Zellversuch gewonnen Ergebnisse im Tierversuch nachvollziehen lassen.

4.4.1 MEHP hat nach aerosoler Exposition keinen signifikanten Einfluss auf die Regulierung der Genexpression von ADRP in Alveolarmakrophagen in Balb/c-Mäusen

Klimich et al. beschrieben bereits 1992 nach aerosoler Exposition von Ratten mit DEHP eine Zunahme der Alveolarmakrophagen und speziell der Schaumzellen in den Lungen der Versuchstiere [60]. Wie oben beschrieben besteht ein Zusammenhang zwischen der vermehrten Expression von ADRP in Makrophagen und ihrer Umwandlung in Schaumzellen. Hansen et al. beobachteten 2007 auch nach aerosoler Exposition mit MEHP eine deutliche Zunahme der Alveolarmakrophagen in den behandelten Balb/c-Mäusen [37]. Über eine Veränderung der Genexpression in diesen Alveolarmakrophagen nach vorangegangener Exposition mit einem Phthalat liegen bisher keine Daten vor. Eine Analyse der Genexpression in den aus der BAL gewonnen Alveolarmakrophagen mittels real Time PCR konnte die im Zellversuch gemessene deutliche Up-Regulierung der Genexpression von ADRP nicht bestätigen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von ADRP zwischen Kontrollgruppe und stimulierten Gruppen. Im Tiermodell lässt sich also ein positiv-regulatorischer Effekt auf die

Genexpression von MEHP nicht bestätigen. Eine Erklärung könnten die multiplen Einflüsse und externen Stimuli sein, denen Alveolarmakrophagen im Tiermodell im Gegensatz zu den stabilen, reproduzierbaren Verhältnissen im In-vitro-Zellversuch ausgesetzt sind. Wahrscheinlich unterliegt die Regulierung der Genexpression in murinen Makrophagen im Tiermodell nach Exposition mit MEHP weit komplexeren und multifaktoriellen Zusammenhängen.

4.4.2 MEHP führt nach aerosoler Exposition zu einer Up-Regulierung der Genexpression von CXCR4 in Alveolarmakrophagen in Balb/c-Mäusen

Die Transkriptomuntersuchung mittels DNA-Mikroarray in Zellen der Zelllinie J774 nach Exposition mit MEHP zeigte eine 2,8-fache Down-Regulation ($p < 0,001$), die sich in der anschließenden quantitativen Analyse mittels real Time PCR als valide erwiesen hatte. Durch eine Analyse der Genexpression in den aus der BAL gewonnen Alveolarmakrophagen mittels real Time PCR wurde der Einfluss einer aerosolen MEHP Exposition auf die Genexpression von CXCR4 in den isolierten Alveolarmakrophagen der Versuchstiere untersucht. Die Genexpressionsanalyse zeigte einen zu den in vitro gewonnen Ergebnissen gegenteiligen Effekt. Es zeigte sich eine 2,2-fache Up-Regulation für CXCR4 ($p < 0,05$). Es ist somit anzunehmen, dass eine aerosole In-vivo-Exposition von Balb/c-Mäusen mit MEHP über eine Steigerung der CXCR4-Genexpression in Alveolarmakrophagen zu einer Beeinflussung der Immunmodulation nach Kontakt mit MEHP führt. Die gegenteiligen Effekte dieser Exposition, die sich in den In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zeigten, machen deutlich, dass der Einfluss von MEHP auf die Genexpression von CXCR4 nicht als direkter Effekt zu werten ist, sondern dass bisher unbekannte zusätzliche Mechanismen ursächlich sind, die sich in der artifiziellen Umgebung des Zellversuches nicht generieren lassen.

4.4.3 MEHP führt nach aerosoler Exposition zu einer Up-Regulierung der Genexpression von PPAR δ in Alveolarmakrophagen in Balb/c-Mäusen

Eine Analyse der Genexpression der Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptoren PPAR α , PPAR δ und PPAR γ hatte im Zellversuch nach Exposition mit MEHP lediglich einen signifikanten Effekt für PPAR γ gezeigt. Die Analyse der Genexpression in den aus der BAL gewonnen Alveolarmakrophagen mittels real Time PCR sollte den Einfluss einer aerosolen MEHP Exposition auf die Genexpression der PPARs in den isolierten Alveolarmakrophagen der Versuchstiere klären. Die In-vivo-Analysen zeigten zu den in vitro gewonnen Ergebnissen differente Effekte. Nach der beschriebenen Exposition der Versuchstiere mit MEHP zeigte sich eine 5,9-fache Up-Regulation ($p < 0,01$) der Genexpression für PPAR δ in den untersuchten Alveolarmakrophagen. Die Genexpression des PPAR γ wurde nicht signifikant reguliert. Wie auch in den J774-Zellen war die gemessene Konzentration an RNA für PPAR α in den untersuchten Alveolarmakrophagen so gering, dass eine valide Messung der Regulation der Genexpression nicht möglich war.

In aktuellen Arbeiten wird der Rolle des PPAR δ auf die Regulation des Stoffwechsels in Makrophagen näher untersucht [19,28,59]. PPAR δ scheint demnach neben PPAR γ in Makrophagen eine Schlüsselrolle bei der Regulation verschiedener Stoffwechselwege einschließlich des Fettstoffwechsels inne zu haben. Desvergne et. al beschreibt eine direkte Aktivierung von Makrophagen in Lunge und Leber durch PPAR δ [19]. Kang et. zeigten, dass eine mangelnde PPAR δ -Expression in Makrophagen zu Entzündungsreaktionen und einer deutlichen Stoffwechselstörung in Adipozyten führten [59]. Fürsinn et al. zeigten schließlich unter anderem, dass eine PPAR δ -Aktivierung in Makrophagen durch eine verminderte Expression inflammatorisch wirksamer Gene eine antiinflammatorische Wirkung hat [28].

4.5 Einfluss einer aerosoler Exposition mit MEHP auf die Regulierung der Genexpression im Lungenparenchym von Balb/c-Mäusen

Nach aerosoler Exposition mit MEHP von Balb/c-Mäusen (s. 2.1.2) wurde das Genexpressionsmuster der Alveolarmakrophagen der BAL der Versuchstiere wie oben beschrieben untersucht. Um einen direkten Einfluss des MEHP auf das Lungenparenchym der Versuchstiere zu untersuchen, wurden einzelne Lungen wie in 2.1.5 beschrieben aufgearbeitet, die enthaltene RNA extrahiert, aufgereinigt, transkribiert und anschließend mittels real time PCR analysiert. Ein Problem bei diesem Verfahren ist, dass die neben Pneumozyten noch im Lungenparenchym enthaltenen anderen Zelltypen in die Analyse mit eingehen. Eine möglicherweise gegensätzliche Auswirkung der MEHP-Exposition auf die Genexpression der verschiedenen Zelltypen könnte letztendlich in der Summe eine signifikante Regulation verschleiern.

4.5.1 MEHP hat nach aerosoler Exposition keinen signifikanten Einfluss auf die Regulierung der Genexpression von ADRP im Lungenparenchym von Balb/c-Mäusen

Schultz et al. postulierte 2002 erstmals, dass ADRP bei der Phospholipidsynthese des alveolaren Surfactant durch Typ II Pneumozyten eine zentrale Rolle spielt, indem es den interzellulären Lipidtransport gewährleistet, der für die Phospholipidsynthese des alveolaren Surfactant von entscheidender Bedeutung ist [115]. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise widerlegt [79], neuere Studien [132,133] legen jedoch nahe, dass ADRP eine wichtige Rolle in der pulmonalen Organogenese und bei der Ausbildung spezieller pulmonaler Pathomechanismen inne hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde wie oben beschrieben die Genexpression des ADRP im Lungengewebe analysiert. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der mit MEHP behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe. ADRP scheint also nicht in der Ausbildung einer pathologischen

Atemwegsreaktion durch Veränderungen im Lungengewebe nach aerosoler Exposition mit MEHP beteiligt zu sein.

4.5.2 MEHP hat nach aerosoler Exposition keinen signifikanten Einfluss auf die Regulierung der Genexpression von CXCR4 im Lungenparenchym von Balb/c-Mäusen

CXCR4 wird im Lungenparenchym vor allem von den pulmonalen Endothelzellen exprimiert. Wie oben dargestellt wurde die Genexpression des CXCR4 im Lungengewebe analysiert. Hierbei zeigten sich wie auch schon für ADRP keine signifikanten Unterschiede zwischen der mit MEHP behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe. MEHP scheint also nach aerosoler Exposition im Tierversuch in erster Linie Einfluss auf die Genexpression von CXCR4 intraluminal vorkommender Makrophagen des bronchoalveolären Systems und weniger auf die Genexpression im Lungenparenchym selber zu haben.

4.5.3 MEHP führt nach aerosoler Exposition zu einer Up-Regulierung der Genexpression von PPAR δ im Lungenparenchym von Balb/c-Mäusen

Um zu analysieren, ob die aerosole Exposition mit MEHP im Tierversuch zu einer Änderung der Genexpression der PPARs im murinen Lungengewebe führt, wurde wie oben beschrieben eine Genexpressionsanalyse mittels real Time PCR durchgeführt. Die Messungen ergaben eine 1,3-fache Up-Regulation ($p < 0,05$) der Genexpression für PPAR δ im Lungenparenchym der untersuchten Versuchstiere. Für PPAR γ und PPAR α zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Genexpression in stimulierten Tieren und Tieren der Kontrollgruppe. Festzuhalten ist, dass die gemessene Konzentration an RNA für PPAR α im Lungengewebe deutlich höher ist als in den untersuchten Makrophagen.

Über einen Einfluss von der PPARs auf die Modulation des Stoffwechsels in Alveolarmakrophagen und die PPAR-vermittelte Regulation der Immunantwort durch Alveolarmakrophagen liegen bereits Daten vor [19,25,28,59,105]. Über die Rolle der PPARs im Lungengewebe selbst ist bisher wenig bekannt. Die Ergebnisse einer Arbeit von Standiford legen nahe, dass PPAR γ auch einen Einfluss auf die Reaktion des Lungengewebes im Rahmen einer akuten Atemwegsreaktion hat [125]. Doch auch PPAR δ scheint, wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, in die Regulation und Vermittlung einer Reaktion des Lungengewebes im Rahmen einer aerosoler Exposition mit MEHP einzugreifen.

5 Zusammenfassung

Seit mehr als 40 Jahren werden Phthalate als Weichmacher für Kunststoffe eingesetzt und in großer Menge produziert. Die Phthalate und insbesondere Di(2-Ethylhexyl)Phthalat (DEHP) und sein Hauptmetabolit Mono(2-ethylhexyl)phthalat (MEHP) stehen seit Jahren im Mittelpunkt kontroverser Diskussionen zur Toxizität für den Menschen. Phthalate sind insbesondere in Medizinprodukten wie Dialyse-, Infusions- und Beatmungsschläuchen, Blutbeuteln, aber auch Kinderspielzeug und Beißringen in großer Menge vorhanden. Phthalate sind nicht kovalent an den Kunststoff gebunden und können so in die Umgebung ausgasen und vom Menschen aufgenommen werden. Aufgrund dieser Tatsache verabschiedete die Kommission der Europäischen Gemeinschaften am 7. Dezember 1999 eine Notfallverordnung, die schließlich am 5. Juli 2005 in einer Richtlinie des Europäischen Parlaments gipfelte und eine Verwendung dieser Substanzen in Kinderspielzeug untersagt. Die toxische Wirkung von MEHP auf Gonaden und Leber ist am besten untersucht. Über die Wirkung von MEHP auf den Respirationstrakt ist bisher wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurde in vivo und in vitro die Wirkung von MEHP auf Zellen des Respirationstraktes untersucht.

Die Wirkung des Weichmachers MEHP auf die Atemwege wurde im Mausmodell durch eine Aerosolexposition ausgelöst. In anschließenden plethysmographischen Messungen wurde die Entwicklung einer Atemwegshyperreagibilität nachgewiesen. Die Atemwegshyperreagibilität war mit einer signifikanten Veränderung des zellulären Lungeninfiltrates verbunden. Die ausgewaschenen Zellen bestanden dabei ausschließlich aus Makrophagen, weshalb Makrophagen im Fokus der weiteren Untersuchungen standen.

Im nächsten Schritt wurde eine murine, makrophagenähnliche Zelllinie mit MEHP stimuliert und anschließend eine Transkriptomuntersuchung mittels DNA-Mikroarrays durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Exposition mit MEHP bei

einer Vielzahl von Genen Einfluss auf die Regulation der Genexpression nimmt. Neben vielen Genen, die eine Rolle im Rahmen der Translation und Transkription spielen, zeigte sich ebenfalls eine Regulation verschiedener Stoffwechselgene und Genen, die Einfluss auf die Regulation und Steuerung der Immunantwort nehmen. So wurden beispielsweise eine signifikante Up-Regulation der Genexpression des Adipose differentiation related Protein (ADRP) und eine Downregulation der Genexpression des Chemokinrezeptors 4 (CXCR4) nachgewiesen, die sich auch in einer anschließenden quantitativen Analyse mittels Real time PCR als valide erwiesen.

Für die In-vitro-Stimulationsversuche zur Transkriptomuntersuchung wurde in einem Versuchsansatz - dem aktuellen Goldstandard folgend - MEHP in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in einem weiteren Versuchsansatz auf den Einsatz von DMSO verzichtet. Ein Vergleich der Ergebnisse beider Transkriptomuntersuchungen zeigte, dass in DMSO gelöstes MEHP zu einer stärkeren Regulation der Genexpression vieler Gene führt als reines MEHP. In Zukunft muss also der Einsatz von DMSO als Lösungsmittel in der Phthalatforschung kritisch bewertet werden, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Veränderung des Genexpressionsverhaltens in der Zellkultur zu vermeiden.

Eine Hauptwirkung der Phthalate, die bereits in vielen Arbeiten vor allem für Endothelzellen und Hepatozyten untersucht wurde, ist die Funktion als Ligand der Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptoren (PPAR), über die auch MEHP in eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen und zellulären Regulationsmechanismen eingreift. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Zellversuch auch in murinen Makrophagen eine Exposition mit MEHP zu einer Up-Regulation der PPAR-Isoform PPAR γ führt. Für PPAR δ zeigte sich im Tierversuch sowohl in Alveolarmakrophagen als auch im Lungenparenchym eine signifikante Up-Regulation der Genexpression. Die Konzentration an PPAR α war in den verwendeten murinen Makrophagen für eine valide Genexpressionsanalyse zu gering.

Es bleibt festzuhalten, dass auch in murinen Makrophagen die PPARs eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der toxischen Wirkung nach Exposition mit MEHP zu spielen scheinen.

In einem weiteren Schritt wurde in Kenntnis der in vitro gewonnenen Daten zu Änderungen der Genexpression nach Stimulation mit MEHP eine Genexpressionsanalyse der Zellen der bronchoalveolären Lavage der im Tierversuch verwendeten Tiere mittels Real time PCR durchgeführt. Die in vitro gewonnen Erkenntnisse ließen sich nur zum Teil in den Alveolarmakrophagen nachvollziehen. Aber gerade einer deutlichen Up-Regulation des ADRP, die sich auch in den Alveolarmakrophagen zeigte, scheint eine zentrale Rolle bei der Vermittlung verschiedener Regulationsmechanismen nach aerosoler Exposition mit MEHP zuzukommen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Weichmacher MEHP nach aerosoler Exposition zu morphologischen und molekularbiologischen Veränderungen im Respirationstrakt führt. Über den genauen Krankheitswert können bisher keine Aussagen getroffen werden. Die augenscheinlich sehr komplexen und vielschichtigen Prozesse und Mechanismen, die aus einer aerosolen MEHP-Exposition resultieren (s.7.5), sollten Anlass für weitere Untersuchungen sein.

Summary

Phthalates have been used as plasticisers of plastics for more than 40 years. Phthalates and Di(2-Ethylhexyl)Phthalat (DEHP) with its main metabolite Mono(2-ethylhexyl)phthalat (MEHP) have been a focal point of controversies regarding their toxicity in human beings. They are primarily used in medical supplies such as hemodialysis tubings, bloodbags or respiratory equipment, but also in toys and teethingers. The European Community passed an emergency decree in December 1999 which was transformed into a directive of the European parliament in July 2005 prohibiting the use of most phthalates in children's toys. Whereas the toxic effects of MEHP on gonads and liver are well researched, little is known about effects of MEHP on the respiratory system. The research conducted in this thesis has analysed in vivo and in vitro effects of MEHP on the respiratory system. The effects of MEHP in an allergical murine model were triggered by exposition to aerosols of MEHP. Plethysmographic measurements showed the development of airway hyperreactivity connected to a significant alteration of pulmonary cellular infiltrate. Cells that were washed out consisted only of macrophages. The murine cell-line J774 closely resembling macrophages was stimulated with MEHP and analysed by transcriptome measurements using DNA-microarrays. Exposure to MEHP led to regulation of genetic expression in various genes. Adipose differentiation related protein (ADRP) was upregulated, whereas chemokine receptor 4 (CXCR4) showed a downregulation, both being certified with a quantitative real-time PCR analysis. Both in cell lines of endothel and hepatocytes, phthalates play a major role as possible ligands of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). The results of research conducted in this thesis demonstrate an up-regulation of the PPAR-isoform PPAR γ in murine macrophages when exposed to MEHP. Furthermore a significant up-regulation of PPAR δ could be accounted for in alveolar macrophages and lung tissue. The concentration of PPAR α in murine macrophages of the study was too low for a valid analysis of genetic expression. In another investigation alveolar-macrophages from animal experiments were tested for their genetic expression. The in vitro test results could be traced only partly in alveolar macrophages. Nevertheless, a significant up-regulation of ADRP which also showed in alveolar macrophages seems to play a crucial role in the exchange of regulatory mechanisms after exposition to aerosol MEHP. Results of the present work show that an exposition to MEHP in aerosol form leads to pathological alterations of the murine respiratory tract. The apparently very complex processes and mechanisms resulting from an exposition to an aerosol of MEHP should give rise to further studies with the individual genes.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Agarwal DK, Lawrence WH, Turner JE, Autian J. Effects of parenteral di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on gonadal biochemistry, pathology, and reproductive performance of mice. *J Toxicol Environ Health* 1989;26:39-59.
- 2 Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL, Jordan S, Matthews HB. Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ Health Perspect* 1982;45:19-25
- 3 Albro PW, Lavenhar SR. Metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Drug Metab Re* 1989;21:13-34
- 4 Albro, PW. Absorption, metabolism and excretion of di(2-ethylhexyl) phthalate by rats and mice. *Environ. Health Perspect* 65; 293-298 (1986)
- 5 Azevedo, I., de Blic, J., Scheinmann, P., Vargaftig, B. B., and Bachelet, M. Enhanced arachidonic acid metabolism in alveolar macrophages from wheezy infants. Modulation by dexamethasone. *Am J Resp Crit Care Med* 152[4], 1208-1214. 1995.
- 6 Bally MB, Opheim DJ, Shertzer HG. Di-(2-ethylhexyl) phthalate enhances the release of lysosomal enzymes from alveolar macrophages during phagocytosis. *Toxicology*. 1980;18(1):49-60
- 7 Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999;4:585-95.
- 8 Bility MT, Thompson JT, McKee RH, David RM, Butala JH, Vanden Heuvel JP, Peters JM. Activation of mouse and human peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) by phthalate monoesters. *Toxicol Sci* 82(1): 170-82 (2004)
- 9 Bornehag CG, Sundell J, Weschler CJ, Sigsgaard T, Lundgren B, Hasselgren M, Hägerhed-Engman L. The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study. *Environ Health Perspect* 112(14): 1393-7 (2004)
- 10 Boström P, Magnusson B, Svensson PA, Wiklund O, Borén J, Carlsson LM, Ståhlman M, Olofsson SO, Hultén LM. Hypoxia converts human macrophages into triglyceride-loaded foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Aug;26(8):1871-6. Epub 2006 Jun 1.
- 11 Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, Spiegelman BM. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev*. 1996 Apr 15;10(8):974-84.
- 12 Cadogan DF, Howick CJ. Plasticizers. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Vol 19. New York: John Wiley and Sons, 258-290 (1996)

- 13 Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology*. 1994 Aug;135(2):798-800.
- 14 Clark K, Cousin IT, Mackay D, Yamada K. Phthalate Esters: Observed concentrations in the environment. 2003 *Handb. Environ. Chem.* vol:3Q 125-177
- 15 Clark K, Cousins IT, Mackay D. Assessment of critical exposure pathways. *The Handbook of Environmental Chemistry*. ed. New York: Springer-Verlag: 127-162 (2003)
- 16 Clayson DB, Mehta R, Iverson F. International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Oxidative DNA damage – the effects of certain genotoxic and operationally non-genotoxic carcinogens. *Mutation Research* 317(1): 25-42 (1994)
- 17 Contreras TJ, Sheibley RH, Valeri CR. Accumulation of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in whole blood, platelet concentrates, and platelet-poor plasma. *Transfusion*. 1974; 14 :34 –46
- 18 Desjardins SF, Berchiche YA, Haddad E, Heveker N. Multiple talents of the chemokine receptor-CXCR4. *Med Sci (Paris)*. 2007 Nov;23(11):980-4.
- 19 Desvergne B. PPARdelta/beta: the lobbyist switching macrophage allegiance in favor of metabolism. *Cell Metab*. 2008 Jun;7(6):485-95.
- 20 Di Poi N, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Functions of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in skin homeostasis. *Lipids* 2004;39:1093-9
- 21 Doull J, Cattley R, Elcombe C, Lake BG, Swenberg J, Wilkinson C, Williams G, Gemert M. A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. *Regul Toxcol Pharmacol* 29: 327-357 (1999)
- 22 Dreyer, C., Keller, H., Mahfoudi, A., Laudet, V., Krey, G., and Wahli, W. Positive regulation of the peroximal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Bio Cell* 77, 67-76. 1993
- 23 Dubitsky, A., Defiglia, J. Stripping of Digoxigenin-Labelled Probes from Nylon Membranes. *BioTechniques* 1995, 19:210-212
- 24 European Council for Plasticisers and Intermediates. The mechanism of plasticiser action. 24-1-2000. Ref Type: Data File
- 25 Feige JN, Gelman L, Rossi D, Zoete V, Métivier R, Tudor C, Anghel SI, Grosdidier A, Lathion C, Engelborghs Y, Michielin O, Wahli W, Desvergne B. The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. *J Biol Chem*. 2007 Jun 29;282(26):19152-66.

- 26 Fromme H, Bolte G, Koch HM, Angerer J, Boehmer S, Drexler H, Mayer R, Liebl, R. Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *Int J Hyg Environ Health*. 2007 Jan;210(1):21-33
- 27 Fromme H, Kuchler T, Otto T, Pilz K, Muller J, Wenzel A. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment *Water Res*. 2002 Mar;36(6):1429-38.
- 28 Fürnsinn C, Willson TM, Brunmair B. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta, a regulator of oxidative capacity, fuel switching and cholesterol transport. *Diabetologia*. 2007 Jan;50(1):8-17.
- 29 Gao L, Li Y, Pei X, Chen X. Effects of Di(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP) on mouse embryos development in vitro. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2003 May;32(3):198-200
- 30 Gerstoft J, Christiansen E, Nielsen IL, Nielsen B. The migration of plasticisers from PVC haemodialysis tubes. *Proc Eur Dial Transplant Assoc*.1979; 16 :739 –740
- 31 Gibson TP, Briggs WA, Boone BJ. Delivery of di-2-ethylhexyl phthalate to patients during hemodialysis. *J Lab Clin Med*.1976; 87 :519 –524
- 32 Glue, C., Platzer, M. H., Larsen, S. T., Nielsen, G. D., Skov, P. S., and Poulsen, L. K. Phthalates Potentiate the Response of Allergic Effector Cells. *Pharmacol.Toxicol* 96, 140-142. 2005
- 33 Gray TJB and Butterworth KR. Testicular atrophy produced by phthalate esters (1980). *Arch Toxicol Suppl* 4, 452-455
- 34 Gray TJB, Butterworth KR, Gaunt LE, Grasso P and Gangolli SD. Short-term toxicity study of di(2-ethylhexyl) phthalate in rats (1977). *Fd Cosmet Toxicol* 15, 389-399
- 35 Gray TJB, Rowland IR, Foster PMD and Gangolli SD (1982). Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicol Lett* 11, 141-147
- 36 Hansen JS, Larsen ST, Poulsen LK, Nielsen GD. Adjuvant effects of inhaled mono-2-ethylhexyl phthalate in BALB/cJ mice. *Toxicology*. 2007 Mar 22;232(1-2):79-88. Epub 2006 Dec 17.
- 37 Hansen JS, Larsen ST, Poulsen LK, Nielsen GD. Adjuvant effects of inhaled mono-2-ethylhexyl phthalate in BALB/cJ mice. *Toxicology*. 2007 Mar 22;232(1-2):79-88.
- 38 Hellwig J, Freudenberger H, Jackh R. Differential prenatal toxicity of branched phthalate esters in rats. *Food Chem Toxicol*. 1997 May;35(5):501-12
- 39 Holden PR, Odum J, Soames AR, Foster JR, Elcombe CR, Tugwood JD. Immediate early gene expression during regenerative and mitogen-induced liver growth in the rat. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology* 12(2): 79-82 (1998)
- 40 <http://www.bioteach.ubc.ca/MolecularBiology/microarray>, (2007)
- 41 <http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/cl2926.html>

- 42 <http://www.enius.de/schadstoffe/weichmacher.html>, (2007)
- 43 <http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/ccr/TKGdata/TKGvol02/TKG0208.html>
- 44 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
- 45 <http://www.plasticisers.org/index.asp?page=5> (2007)
- 46 <http://www.wiwo.de/unternehmer-maerkte/basf-gibt-dehp-produktion-in-europa-auf-104528/>
- 47 http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi
- 48 <http://www.umweltlexikon-online.de/fp/archiv/RUBwerkstoffmaterialsubstanz/Weichmacher.php>, (2007)
- 49 Huber WW, Grasl-Kraupp B, Schulte-Hermann R. Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. *Crit Rev Toxicol*. 1996 Jun;26(4):365-481
- 50 Hurst CH, Waxman DJ. Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicol Sci*. 2003 Aug;74(2):297-308.
- 51 Inoue I, Shino K, Noji S, Awata T, Katayama S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun* 246(2): 370-4 (1998)
- 52 Isenberg JS, Kamendulis LM, Smith JH, Ackley DC, Pugh G Jr, Lington AW, Klaunig JE. Effects of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on gap-junctional intercellular communication (GJIC), DNA synthesis, and peroxisomal beta oxidation (PBOX) in rat, mouse, and hamster liver *Toxicol Sci*. 2000 Jul;56(1):73-85
- 53 Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347(6294): 645-50 (1990)
- 54 Itsuki-Yoneda A, Kimoto M, Tsuji H, Hiemori M, Yamashita H. Effect of a hypolipidemic drug, Di (2-ethylhexyl) phthalate, on mRNA-expression associated fatty acid and acetate metabolism in rat tissues. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007 Feb;71(2):414-20. Epub 2007 Feb 7
- 55 Jaakola, J. J., Oie, L., Nafstad, P., Botten, G., Samuelson, S. O., and Magnus, P. Interior surface materials in the home and the development of bronchial obstruction in young children in Oslo, Norwa. *Am Pub Health* 89, 188-192. 1999.
- 56 Javid B, MacAry PA, Lehner PJ. Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *J Immunol*. 2007 Aug 15;179(4):2035-40. Review.
- 57 Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391(6662): 82-6 (1998)
- 58 Kambia K, Dine T, Gressier B, et al. High-performance liquid chromatographic method for the determination of di(2-ethylhexyl) phthalate in total parenteral nutrition and in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001;755:297-303

- 59 Kang K, Reilly SM, Karabacak V, Gangl MR, Fitzgerald K, Hatano B, Lee CH. Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2008 Jun;7(6):467-9.
- 60 Klimich HJ, Gamer AO, Hellwig J, Kaufmann W, Jackh R. Di-(2-ethylhexyl) phthalate: a short-term repeated inhalation toxicity study including fertility assessment. *Food Chem Toxicol* 1992;30:915-9.
- 61 Koch HM, Drexler H, Angerer J. An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *Int J Hyg Environ Health.* 2003 Mar;206(2):77-83
- 62 Koo HJ, Lee BM. Toxicokinetic relationship between di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *J Toxicol Environ Health A.* 2007 Mar 1;70(5):383-7
- 63 Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999;4:597-609
- 64 Kurane R. Microbial degradation of phthalate esters. *Microbiol Sci* 1986;3:92-5.
- 65 Lahousse SA, Beall SA, Johnson KJ. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly increases celsr2 protein phosphorylation in HeLa cells via protein kinase C and casein kinase 1. *Toxicol Sci.* 2006 May;91(1):255-64.
- 66 Lake BG, Gangolli SD, Grasso P, Lloyd AG. Studies on the hepatic effects of orally administered di-(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 32: 355-367 (1975)
- 67 Larsen, S. T., Hansen, J. S., Thygesen, P., Begtrup, M., Poulsen, O. M., and Nielsen, G. D. Adjuvant and immuno-suppressive effect of six monophthalates in a subcutaneous injection model with BALB/c mice. *Toxicology* 169[1], 37-51. 2001
- 68 Latini G, Del Vecchio A, Massaro M, Verrotti A, DE Felice C. In utero exposure to phthalates and fetal development. *Curr Med Chem.* 2006;13(21):2527-34. Review.
- 69 Lee MH, Park J, Chung SW, Kang BY, Kim SH, Kim TS. Enhancement of interleukin-4 production in activated CD4+ T cells by diphthalate plasticizers via increased NF-AT binding activity. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004 Jul;134(3):213-22. Epub 2004 Jun 1
- 70 Legislative Entschließung des Europäischen Parlaments zu dem Gemeinsamen Standpunkt des Rates im Hinblick auf den Erlass der Richtlinie des Europäischen Parlaments und des Rates zur 22. Änderung der Richtlinie 76/769/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten betreffend Beschränkungen des Inverkehrbringens und der Verwendung gewisser gefährlicher Stoffe und Zubereitungen (Phthalate in Spielzeug und Babyartikeln) (5467/1/2005 – C6-0092/2005 – 1999/0238 (COD)) 2

- 71 Lewis LM, Flechtner TW, Kerkay J, Pearson K, Nakamoto S. Bis(2-ethylhexyl)phthalate concentrations in the serum of hemodialysis patients. *Clin Chem.*1978; 24 :741 –746
- 72 Lhuguenot JC, Mitchell AM, Milner G, Lock EA, Elcombe CR. The metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) in rats: in vivo and in vitro dose and time dependency of metabolism *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985 Aug;80(1):11-22
- 73 Li LH, Jester WF, Jr. Laslett AL, Orth JM. A single dose of Di-(2ethylhexyl) phthalate in neonatal rats alters gonocytes, reduces sertoli cell proliferation and decreases cyclin D2 expression (2000). *Toxicol Appl Pharmacol* 166(3): 222-9.
- 74 LightCycler Operator's Manual Version 3.5
- 75 Llorente-Cortés V, Royo T, Juan-Babot O, Badimon L. Adipocyte differentiation-related protein is induced by LRP1-mediated aggregated LDL internalization in human vascular smooth muscle cells and macrophages. *J Lipid Res.* 2007 Oct;48(10):2133-40. Epub 2007 Jul 9.
- 76 Loff S, Kabs F, Witt K, et al. Polyvinylchloride infusion lines expose infants to large amounts of toxic plasticizers. *J Pediatr Surg.* 2000;35: 1775–1781
- 77 Loff S, Kabs F, Witt K, Sartoris J, Mandl B, Niessen KH, Waag KL. Polyvinylchloride infusion lines expose infants to large amounts of toxic plasticizers. *J Pediatr Surg.* 2000 Dec;35(12):1775-81.
- 78 Lovekamp-Swan T, Davis JC. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect* 111(2): 139-45 (2003)
- 79 Magra AL, Mertz PS, Torday JS, Londos C. Role of adipose differentiation-related protein in lung surfactant production: a reassessment. *J Lipid Res.* 2006 Nov;47(11):2367-73.
- 80 Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, Boisen KA, Damgaard IN, Chellakooty M, Schmidt IM, Suomi AM, Virtanen HE, Petersen DV, Andersson AM. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect.* 2006 Feb;114(2):270-6.
- 81 Maloney EK, Waxman DJ. trans-Activation of PPARalpha and PPARgamma by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999 Dec 1;161(2):209-18.
- 82 Marcel YL. Determination of di-2-ethylhexyl phthalate levels in human blood plasma and cryoprecipitates. *Environ Health Perspect.*1973; 3 :119 –121
- 83 Marx N, Mackman N, Schönbeck U, Yilmaz N, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes. *Circulation* 103(2): 213-9 (2001)
- 84 Marx N, Schönebeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator activated receptor α activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83(11): 1097-103 (1998)

- 85 Marx N, Sukhova G, Collins T, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule 1 expression in human endothelial cell. *Circulation* 99(24): 3125-31 (1999)
- 86 Marx N. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep* 4(1): 71-7 (2002)
- 87 Masuda Y, Itabe H, Odaki M, Hama K, Fujimoto Y, Mori M, Sasabe N, Aoki J, Arai H, Takano T. ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells. *J Lipid Res.* 2006 Jan;47(1):87-98. Epub 2005 Oct 17.
- 88 Michalik L, Desvergne B, Tan NS, Basu-Modak S, Escher P, Rieusset J et al. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol* 2001;154:799-814
- 89 Minge CE, Ryan NK, Van Der Hoek KH, Robker RL, Norman RJ. Troglitazone regulates peroxisome proliferator-activated receptors and inducible nitric oxide synthase in murine ovarian macrophages. *Biol Reprod.* 2006 Jan;74(1):153-60.
- 90 Mitchell FE, Bridges JW, Hinton RH. Effects of mono (2-ethylhexyl) phthalate and its straight chain analogues mono-n-hexylphthalate and mono-n-octyl phthalate on lipid metabolism in isolated hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 1986 Sep 1;35(17):2941-7.
- 91 Moody DE, Reddy JK. Hepatic peroxisome (microbody) proliferation in rats fed plasticisers and related compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 45: 497-504 (1978)
- 92 National Toxicology Program, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction. NTP-CERHR Expert Panel Report on Di(2-Ethylhexyl)Phthalate. Alexandria, VA: Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, US Department of Health and Human Services; 2000.
- 93 Neve BP, Corseaux D, Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Duriez P, Staels B, Jude B. PPARalpha agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. *Circulation* 103(2): 207-12 (2001)
- 94 Oishi S. Effects of co-administration of di(2-ethylhexyl)phthalate and testosterone on several parameters in the testis and pharmacokinetics of its mono-de-esterified metabolite. *Arch Toxicol* 1989;63:289-95.
- 95 Oishi S. Reversibility of testicular atrophy induced by Di(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Environ Res* 1985;36:160-9.
- 96 Oishi S. Testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl)phthalate: changes in histology, cell specific enzyme activities and zinc concentrations in rat testis. *Arch Toxicol* 1986;59:290-5.
- 97 Peck CC, Odom DG, Albro PW, Jess DA, Barrett BB. Effect of heat on the conversion of di-2-ethylhexyl phthalate to mono-2-ethylhexyl phthalate in human plasma. *Transfusion* 1981;21:163-6

- 98 Peck CC, Odom DG, Friedman HI, Albro PW, Hass JR, Brady JT, Jess DA. Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and mono-2-ethylexyl phthalate (MEHP) accumulation in whole blood and red cell concentrates. *Transfusion* 1979;19:137-46.
- 99 Peters, J. M., Hennuyer, N., Staels, B., Fuchart, J. C., Fievet, C., Gonzalez, F. J., and Auwerx, J. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice. *J Bio Chem* 272, 27307-27312. 1997
- 100 Pfrimmer Nutrica, Presseinformation PN-05-001_01, 21. Januar 2005
Scharmann, W. and Teutsch, G. M. Zur ethischen Abwägung von Tierversuchen. *Altex* 11, 191-198. 1994.
- 101 Price CJ, Tyl RW, Marr MC, Myers CB, Sadler BM, Kimmel CA. Reproductive and Fertility Assessment of Diethylhexyl Phthalate (CAS No. 117-81-7) in CD1 Mice. Research Triangel Park, NC. National Toxicology Program; 1988.
- 102 PVCplus Kommunikations GmbH. 11-1-2000 Ref Type: Data File
- 103 Rao MS, Reddy JK. An overview of peroxisome-induced hepatocarcinogenesis. *Environ Health Perpect* 92: 205-9 (1991)
- 104 Reddy JK, Rao MS. Peroxisome proliferators and cancer: mechanisms and implications. *Trends in Pharmacological Science* 7: 438-43 (1986)
- 105 Reddy RC. Immunomodulatory role of PPAR-gamma in alveolar macrophages. *J Investig Med*. 2008 Feb;56(2):522-7. Review.
- 106 RICHTLINIE 2005/84/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 14. Dezember 2005 zur 22. Änderung der Richtlinie 76/769/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten betreffend Beschränkungen des Inverkehrbringens und der Verwendung gewisser gefährlicher Stoffe und Zubereitungen (Phthalate in Spielzeug und Babyartikeln), Amtsblatt der Europäischen Union vom 27.12.2005, L344 / 41-44
- 107 Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(13): 7614-9 (1998)
- 108 Rininger JA, Goldsworthy TL, Babish JG. Time-course comparison of cell cycle protein expression following partial hepatectomy and Wy-14,643-induced hepatic proliferation in F344 rats. *Carcinogenesis* 18(5): 935-41 (1997)
- 109 Rokos CL, Ledwith BJ. Peroxisome proliferators activate extracellular signal-regulated kinases in immortalized mouse liver cells. *Journal of Biological Chemistry* 272(20): 13452-7 (1997)
- 110 Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999;4:611-7

- 111 Roth B, Herkenrath P, Lehmann HJ, Ohles HD, Homig HJ, Benz-Bohm G et al. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate as plasticizer in PVC respiratory tubing systems: indications of hazardous effects on pulmonary function in mechanically ventilated, preterm infants. *Eur J Pediatr* 1988;147:41-6.
- 112 Roth B, Herkenrath P, Lehmann HJ, Ohles HD, Hömig HJ, Benz-Bohm G, Kreuder J, Younossi-Hartenstein A. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate as plasticizer in PVC respiratory tubing systems: indications of hazardous effects on pulmonary function in mechanically ventilated, preterm infants. *Eur J Pediatr*. 1988 Jan;147(1):41-6.
- 113 Rothenbacher KP, Kimmel R, Hildenbrand S, Schmahl FW, Dartsch PC. Nephrotoxic effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) hydrolysis products on cultured kidney epithelial cells. *Hum Exp Toxicol*. 1998 Jun;17(6):336-42.
- 114 Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995, 270:467-470
- 115 Schultz CJ, Torres E, Londos C, Torday JS. Role of adipocyte differentiation-related protein in surfactant phospholipid synthesis by type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Aug;283(2):L288-96.
- 116 Schulz, C., Rubin, R. J., and Hutchins, G. M. Acute Lung Toxicity and Sudden Death in Rats Following the intravenous Administration of the Plasticizer, Di(2-ethylhexyl)_Phthalate, Solubilized with Tween Surfactants. *Toxicol Appl.Pharmacol*. 33, 514-525. 1975.
- 117 Shea KM, MD, MPH, and the Committee of Environmental Health, Pediatric Exposure and Potential Toxicity of Phthalate Plasticizers, *Pediatrics* 111(6): 1467-74 (2003)
- 118 Shea KM; American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health. Pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers. *Pediatrics*. 2003 Jun;111(6 Pt 1):1467-74. Review
- 119 Silva MJ, Samandar E, Preau JL Jr, Needham LL, Calafat AM. Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology*. 2006 Feb 15;219(1-3):22-32. Epub 2005 Dec 5.
- 120 Silva MJ, Samandar E, Preau JL Jr, Needham LL, Calafat AM. Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology*. 2006 Feb 15;219(1-3):22-32
- 121 Sjöberg P, Bondesson U, Kjellen L, Lindquist NG, Montin G, Ploen L. Kinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate in immature and mature rats and effect on testis. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1985;56:30-7.
- 122 Sjöberg P, Bondesson U, Sedin G, Gustafsson J. Dispositions of di- and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in newborn infants subjected to exchange transfusions. *Eur J Clin Invest*. 1985 Dec;15(6):430-6

- 123 Southern, EM. Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 1975, 98:503-517
- 124 Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebreton M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Furchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR γ but not by PPAR α activators. *Nature* 292(6687): 790-3 (1998)
- 125 Standiford TJ, Keshamouni VG, Reddy RC. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ as a regulator of lung inflammation and repair. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(3):226-31.
- 126 Stellungnahme der Beratungskommission der Sektion Toxikologie der DGPT zu möglichen Gesundheitsgefahren durch Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) aus Medizinprodukten in neonatologischen Intensivstationen; überarbeitete Fassung vom 18.10.2002
- 127 Su T, Waxman DJ. Impact of dimethyl sulfoxide on expression of nuclear receptors and drug-inducible cytochromes P450 in primary rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 424(2): 226-34 (2004)
- 128 Takano H, Yanagisawa R, Inoue K, Ichinose T, Sadakane K, Yoshikawa T. Di-(2-ethylhexyl) phthalate enhances atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Environ Health Perspect.* 2006 Aug;114(8):1266-9
- 129 Teil MJ, Blanchard M, Chevreuil M. Atmospheric fate of phthalate esters in an urban area (Paris-France). *Sci Total Environ.* 2006 Feb 1;354(2-3):212-23
- 130 Tickner JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M, Rossi M. Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review. *Am J Ind Med.* 2001 Jan;39(1):100-11.
- 131 TNO-report, STB-01-55, Alternatives for phthalates. 2001
- 132 Torday JS, Rehan VK. Developmental cell/molecular biologic approach to the etiology and treatment of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res.* 2007 Jul;62(1):2-7. Review.
- 133 Torday JS, Rehan VK. Up-regulation of fetal rat lung parathyroid hormone-related protein gene regulatory network down-regulates the Sonic Hedgehog/Wnt/betacatenin gene regulatory network. *Pediatr Res.* 2006 Oct;60(4):382-8. Epub 2006 Aug 28.
- 134 Treinen KA, Heindel JJ. Evidence that MEHP inhibits rat granulosa cell function by a protein kinase C-independent mechanism. *Reprod Toxicol* 6(2): 143-8 (1992)
- 135 Vessman J, Rietz G. Determination of di(ethylhexyl)phthalate in human plasma and plasma proteins by electron capture gas chromatography. *J Chromatogr.* 1974; 100 :153 –163
- 136 Wams TJ. Diethylhexylphthalate as an environmental contaminant--a review. *Sci Total Environ* 1987;66:1-16

- 137 Watanabe T, Okawa S, Itoga H, Imanaka T, Suga T. Involvement of calmodulin- and protein kinase C-related mechanism in an induction process of peroxisomal fatty acid oxidation-related enzymes by hypolipidemic peroxisome proliferators. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Apr 30;1135(1):84-90.
- 138 Wolfe GW, Layton KA (2003). Diethylhexylphthalate: Multigenerational reproductive assessment by continuous breeding when administered to Sprague-Dawley rats in the diet. TherImmune Research Corporation (Gaithersburg, Maryland), TRC Study No 7244-200
- 139 Xu Y, Agrawal S, Cook TJ, Knipp GT. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate affects lipid profiling in fetal rat brain upon maternal exposure. *Arch Toxicol*. 2007 Jan;81(1):57-62. Epub 2006 Sep 2.
- 140 Xu Y, Agrawal S, Cook TJ, Knipp GT. Maternal di-(2-ethylhexyl)-phthalate exposure influences essential fatty acid homeostasis in rat placenta. *Placenta*. 2008 Nov;29(11):962-9. Epub 2008 Sep 30.
- 141 Xu Y, Cook TJ, Knipp GT. Effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and its metabolites on fatty acid homeostasis regulating proteins in rat placental HRP-1 trophoblast cells. *Toxicol Sci*. 2005 Apr;84(2):287-300. Epub 2005 Jan 12.
- 142 Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L, Farrar WL. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists: PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* 275(7): 4541-4 (2000)

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADRP	Adipose differentiation related protein
ATBC	Acetyltributylcitrat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BBP	Benzylbutylphthalat
BSA	bovines Serumalbumin
CD4	cluster of differentiation 4
cDNA	complementary Desoxyribonucleic acid
CXCR4	Chemokinrezeptor 4
DBP	Dibutylphthalat
DEHA	Di(2-ethylhexyl)adipat
DEHP	Di(2-ethylhexyl)phthalat
DIDP	Di-(isodecyl)phthalat
DINP	Di-(isononyl)phthalat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNOP	Di-n-octylphthalat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EG	Europäische Gemeinschaft
et al.	et alter
FCS	fetales Kälberserum
FSH	Follikel stimulierendes Hormon

HSP	Heat shock protein
KG	Körpergewicht
MEHP	Mono(2-ethylhexyl)phthalat
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PVC	Polyvinylchlorid
RNA	Ribonucleic acid
rt PCR	real time Polymerase chain reaction
s.	siehe
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSC	saline-sodium citrate
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-borate-EDTA
TEA	Tris-acetate-EDTA
UV	Ultraviolett
VLDL	Very low density lipoprotein

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Adipinsäureester (R bezeichnet Alkoholrest)	10
Abb. 2: Zitronensäureester (R bezeichnet Alkoholrest)	10
Abb. 3: Phosphorsäureester (R bezeichnet Alkoholrest)	11
Abb. 4: Trimellitatester (R bezeichnet Alkoholrest)	11
Abb. 5: Phthalsäureester (R bezeichnet Alkoholrest)	12
Abb. 6: Mono(2-ethylhexyl)phthalat.....	14
Abb. 7: Metabolismus von DEHP und MEHP im Menschen [119] (* bereits in Nagetieren identifiziert)	17
Abb. 8: Abb. Prinzip der Microarray Technologie	22
Abb. 9: Ausschnitt aus einem zwei Farben- Microarray unter Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen ausgewertet mittels GMS 418 Array Scanner (Genetic MikroSystems, Woburn, USA)	25
Abb. 10: Protokoll zur Induktion einer Atemwegsreaktion durch Kurzzeitexposition mit MEHP	28
Abb. 11: Gelelektrophorese gereinigter RNA.....	33
Abb. 12: Amplifikationsphasen während der Real-Time-PCR	36
Abb. 13: Erstellen einer Standardkurve	37
Abb. 14: Gelelektrophorese von PCR-Produkten	38
Abb. 15: Hybridisierung in Sandwich-Technik	41

Abb. 16: Konzentrationsabhängiger Anstieg der Anzahl an Makrophagen in der bronchoalveolären Lavage nach aerosoler Exposition weiblicher BALB/c-Mäuse mit MEHP	43
Abb. 17: J774-Zellen in 200-facher Vergrößerung [nach 43]	44
Abb. 18: Validierung der Ergebnisse der Array-Analyse der Genexpressionsregulierung für ADRP in einer J774-Zelllinie nach Exposition mit MEHP	54
Abb. 19: Validierung der Ergebnisse der Array-Analyse der Genexpressionsregulierung für CXCR4 in einer J774-Zelllinie nach Exposition mit MEHP	55
Abb. 20: Regulation der Expression von Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptor γ in J774-Zellen nach Exposition mit MEHP	57
Abb. 21: Regulation der Expression von Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptor δ in J774-Zellen nach Exposition mit MEHP	58
Abb. 22: Regulierung der Genexpression von Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) und Chemokine Rezeptor 4 (CXCR 4) in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP	59
Abb. 23: Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors δ in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP	61
Abb. 24: Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors γ in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP	62

Abb. 25: Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors α in murinem Lungenparenchym durch aerosole Exposition mit MEHP	63
Abb. 26: Regulierung der Genexpression des Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) in murinen Alveolarmakrophagen durch aerosole Exposition mit MEHP	65
Abb. 27: Regulierung der Genexpression des Chemokine Receptor 4 (CXCR 4) in murinen Alveolarmakrophagen durch aerosole Exposition mit MEHP	66
Abb. 28: Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors δ in murinem Alveolarmakrophagen durch aerosole Exposition mit MEHP	68
Abb. 29: Regulierung der Genexpression des Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptors γ in murinem Alveolarmakrophagen durch aerosole Exposition mit MEHP	69
Abb. 30: Primer PPARγ Mus Musculus	71
Abb. 31: Primer PPAR α Mus Musculus	72
Abb. 32: Primer PPARδ Mus Musculus	73
Abb. 33: Primer CXCR4 Mus Musculus	73
Abb. 34: Primer ADRP Mus Musculus	74

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Alkoholreste der Phthalsäureester.....	12
Tab. 2: DEHP-Vorkommen in der Umwelt (nach [136,27,129]).....	13
Tab. 3: Geschätzte DEHP-Aufnahme in verschiedenen Altersgruppen [15]	15
Tab. 4: Transkriptomuntersuchung mittels Microarray unter Verwendung von DMSO als Lösungsmittel.....	48
Tab. 5: Transkriptomuntersuchung mittels Microarray ohne Verwendung von DMSO als Lösungsmittel.....	52

7.4 Transkriptomanalysen

Gen-Name	Fold change MEHP-Stimulation ohne DMSO	Fold change MEHP-Stimulation mit DMSO	Gen-Symbol	CloneID	UGCluster	GenID Spot1
Adipose differentiation related protein	8,2	4,2	Adfp	H3144F06	Mm.381	6350
Preimplantation protein 4	6,0	2,2	Prei4	H3085A01	Mm.211211	9002
Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	5,8	9,8	Malat1	H3109A04	Mm.298256	6012
Preimplantation protein 4	5,3	2,1	Prei4	H3069D02	Mm.211211	9861
Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	4,6	5,4	Malat1	H3010H10	Mm.298256	2563
Tribbles homolog 3 (Drosophila)	4,3	2,3	Trib3	H3035B01	Mm.276018	10782
Interferon-related developmental regulator 1	4,1	5,5	lfrd1	H3057C01	Mm.168	11137
Sequestosome 1	4,0	1,8	Sqstm1	H3013C04	Mm.40828	8015
Solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	3,9	1,9	Slc3a2	H3023A07	Mm.4114	4573
Coiled-coil domain containing 69	3,8	5,5	Ccdc69	H3059E12	Mm.22361	201
Transformed mouse 3T3 cell double minute 4	3,5	2,0	Mdm4	H3052G01	Mm.441419	10854
Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	3,4	3,4	Slc7a2	H3050G05	Mm.4676	8156
CDC-like kinase 1	3,2	1,9	Clk1	H3027C12	Mm.1761	2235

Kinesin family member 5B	3,0	3,1	Kif5b	H3032E04	Mm.223744	7496
Jumonji C domain-containing histone demethylase 1 homolog D (<i>S. cerevisiae</i>)	3,0	2,6	Jhdm1d	H3089G07	Mm.293175	3833
Transformed mouse 3T3 cell double minute 2	3,0	2,1	Mdm2	H3051D04	Mm.22670	8460
Casitas B-lineage lymphoma	2,9	3,3	Cbl	H3064F12	Mm.266871	2053
Mediator complex subunit 13	2,9	2,8	Med13	H3085F02	Mm.341886	9306
Translocated promoter region	2,8	5,7	Tpr	H3045G06	Mm.174256	7968
Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	2,8	3,8	Hsph1	H3020E01	Mm.270681	8923
Arylacetamide deacetylase-like 1	2,8	2,1	Aadacl1	H3055A11	Mm.24576	1581
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	2,8	1,9	Rapgef5	H3058D03	Mm.227642	11308
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	2,6	5,2	Rapgef5	H3063D03	Mm.227642	11212
Myeloid differentiation primary response gene 116	2,6	4,3	Myd116	H3027G12	Mm.4048	2216
Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	2,6	3,7	Hsph1	H3049B07	Mm.270681	4718
Huntingtin	2,6	3,5	Htt	H3137B01	Mm.209071	9087
Signal transducer and activator of transcription 3	2,5	9,7	Stat3	H3158G04	Mm.249934	6709
Remodeling and spacing factor 1	2,5	4,2	Rsf1	H3042C07	Mm.439834	5403
Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 6	2,5	3,6	Slc16a6	H3009H03	Mm.265874	11265
Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)	2,5	2,7	Eif2s2	H3046E08	Mm.377134	4642
Pleckstrin homology domain interacting protein	2,5	2,6	Phip	H3069D01	Mm.221688	9899
Metallothionein 2	2,4	4,9	Mt2	H3013D11	Mm.147226	2562
Structural maintenance of chromosomes 4	2,4	4,6	Smc4	H3067C09	Mm.206841	3914
Ornithine decarboxylase, structural 1	2,4	2,5	Odc1	H3028F05	Mm.34102	7915

Dyskeratosis congenita 1, dyskerin homolog (human)	2,4	2,4	Dkc1	H3066D04	Mm.291062	8418
Glycoprotein 49 A	2,4	2,0	Gp49a	H3159A08	Mm.439661	2966
Tousled-like kinase 2 (Arabidopsis)	2,4	2,0	Tlk2	H3103D06	Mm.126976	6983
Growth arrest-specific 2 like 3	2,3	2,4	Gas2l3	H3070C02	Mm.11982	9746
Zinc finger, AN1-type domain 2A	2,3	2,3	Zfand2a	H3001E11	Mm.24521	1748
G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	2,3	2,2	Gprc5a	H3022D08	Mm.23575	5732
Metallothionein 2	2,2	5,7	Mt2	H3010E09	Mm.147226	4652
Structural maintenance of chromosomes 4	2,2	4,0	Smc4	H3013C12	Mm.206841	2523
Serologically defined colon cancer antigen 1	2,2	1,9	Sdccag1	H3082D02	Mm.46705	10029
Peptidyl-prolyl isomerase G (cyclophilin G)	2,1	4,7	Ppig	H3066E04	Mm.11815	7316
AXIN1 up-regulated 1	2,1	3,6	Axud1	H3085G10	Mm.125196	1041
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta)	2,1	2,9	Eif3s10	H3026D11	Mm.2238	2748
Deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 2	2,1	2,7	Dnttip2	H3072B04	Mm.398647	6307
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta)	2,1	2,5	Eif3s10	H3004D10	Mm.2238	2546
Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14	2,1	1,8	Ptpn14	H3059A12	Mm.4498	220
Membrane-associated ring finger (C3HC4) 7	2,1	1,8	March7	H3015F08	Mm.260635	4841
Similar to Prion-like-(Q/N-rich)-domain-bearing protein family member (pqn-75)	2,1	1,8	Zfp800	H3001B03	Mm.84441	10754
Nucleolar protein 5	2,1	1,8	Nol5	H3032B01	Mm.220367	10764
Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)	2,0	4,6	Eif2s2	H3009C11	Mm.377134	2297
Splicing factor 3b, subunit 1	2,0	4,0	Sf3b1	H3151G01	Mm.279736	9693
Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta)	2,0	3,4	Eif3s10	H3002F06	Mm.2238	7733
SH3 domain containing ring finger 3	2,0	2,6	Sh3rf3	H3026C11	Mm.333078	2387

Kruppel-like factor 4 (gut)	2,0	2,6	Klf4	H3015B01	Mm.4325	10674
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	2,0	2,5	Xrcc1	H3078F10	Mm.4347	644
Heme oxygenase (decycling) 1	2,0	2,5	Hmox1	H3019A12	Mm.276389	1591
Zinc finger CCCH type containing 6	2,0	2,2	Zc3h6	H3071F05	Mm.26377	6364
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit A	2,0	2,0	Atp6v1a	H3021E11	Mm.217787	1496
Ubiquitin C	2,0	1,9	Ubc	H3124H09	Mm.331	4280
Zinc finger CCCH type containing 11A	2,0	1,9	Zc3h11a	H3034D08	Mm.245357	5444
Pellino 1	2,0	1,8	Peli1	H3010H07	Mm.28957	5451
Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	1,9	8,0	Hsp90aa1	H3024C11	Mm.341186	2255
Inositol hexaphosphate kinase 2	1,9	3,3	Ihpk2	H3124E01	Mm.276336	8689
Cold shock domain containing E1, RNA binding	1,9	3,1	Csde1	H3090G02	Mm.277713	9457
Attractin like 1	1,9	2,7	Atrnl1	H3144H02	Mm.245340	9998
Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1	1,9	2,6	Hsp90aa1	H3023G01	Mm.341186	11052
Josephin domain containing 3	1,9	2,2	Josd3	H3104B08	Mm.354115	3297
SUMO/sentrin specific peptidase 6	1,9	2,1	Senp6	H3049D01	Mm.28232	11216
Peptidyl-prolyl isomerase G (cyclophilin G)	1,8	5,3	Ppig	H3072G10	Mm.11815	873
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36	1,8	4,4	Dhx36	H3033E05	Mm.224233	7344
Early growth response 1	1,8	4,0	Egr1	H3092E09	Mm.181959	3053
Nuclear receptor co-repressor 1	1,8	2,6	Ncor1	H3145H12	Mm.271814	1182
GTPase activating protein and VPS9 domains 1	1,8	2,5	Gapvd1	H3001D01	Mm.156452	11552
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	1,8	2,4	Dnaja1	H3018C10	Mm.27897	2503
Septin 7	1,8	2,2	Sep 07	H3013E08	Mm.270259	4348

Nucleolar protein 14	1,7	3,4	Nol14	H3032C03	Mm.40292	11049
Metal response element binding transcription factor 2	1,7	2,8	Mtf2	H3034A04	Mm.257149	7287
Calsyntenin 1	-1,7	-2,3	Clstn1	H3029E06	Mm.38993	7402
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	-1,8	-2,1	Galnt2	H3015A07	Mm.33808	4537
Glucuronidase, beta	-1,8	-2,1	Gusb	H3022D09	Mm.3317	5694
Mannosidase, alpha, class 1C, member 1	-1,8	-2,1	Man1c1	H3103F05	Mm.18905	6280
Pyrroline-5-carboxylate reductase-like	-1,8	-2,2	Pycl	H3116B04	Mm.250599	6391
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11	-1,8	-2,4	Ndufb11	H3111F05	Mm.30084	6202
Karyopherin (importin) alpha 2	-1,8	-2,5	Kpna2	H3021F05	Mm.12508	7633
Glucocorticoid receptor DNA binding factor 1	-1,8	-2,7	Grlf1	H3099B08	Mm.28646	3393
Xylosyltransferase II	-1,9	-2,2	Xylt2	H3023D09	Mm.100638	5580
SAC3 domain containing 1	-1,9	-2,5	Sac3d1	H3086D02	Mm.303924	9933
Polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	-1,9	-3,0	Pole2	H3099E02	Mm.9199	8789
Transmembrane protein 176B	-2,0	-1,8	Tmem176b	H3109H12	Mm.28385	1224
Peptidylprolyl isomerase (cyclophilin) like 5	-2,0	-1,9	Ppil5	H3054A10	Mm.28847	1733
Carbohydrate sulfotransferase 12	-2,0	-2,0	Chst12	H3090F04	Mm.28934	6246
Aurora kinase A	-2,0	-2,0	Aurka	H3013F02	Mm.249363	10485
UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog B (yeast)	-2,0	-3,2	Upf3b	H3046H12	Mm.271160	2799
Defender against cell death 1	-2,1	-2,0	Dad1	H3151D08	Mm.319038	4259
UBX domain containing 6	-2,1	-2,1	Ubx6	H3089A07	Mm.29301	3130
Trafficking protein particle complex 1	-2,1	-3,7	Trappc1	H3118D07	Mm.28073	3997
Replication protein A3	-2,2	-1,8	Rpa3	H3090H03	Mm.29073	9780

Pyrophosphatase (inorganic) 2	-2,2	-1,9	Ppa2	H3076G05	Mm.210305	6857
Phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)	-2,2	-2,2	Pla2g4c	H3105B05	Mm.475717	6431
Cartilage associated protein	-2,2	-2,5	Crtap	H3044A03	Mm.20904	10267
Stearoyl-coenzyme A desaturase 3	-2,2	-2,5	Scd2	H3025B03	Mm.193096	10766
Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2)	-2,2	-3,2	Sfrs1	H3104H02	Mm.473693	9776
F-box and leucine-rich repeat protein 5	-2,2	-3,2	Fbxl5	H3010E02	Mm.25794	10466
Zinc finger protein 710	-2,3	-1,8	Zfp710	H3102F10	Mm.290925	656
Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 19	-2,3	-1,8	Nudt19	H3090A09	Mm.410206	2940
Pituitary tumor-transforming 1	-2,3	-2,2	Pttg1	H3084H09	Mm.6856	4328
Fc receptor, IgG, high affinity I	-2,3	-2,8	Fcgr1	H3109H04	Mm.150	7076
Mitogen-activated protein kinase kinase 6	-2,4	-2,7	Map2k6	H3027F07	Mm.14487	4819
Ets variant gene 5	-2,4	-3,1	Etv5	H3116H10	Mm.155708	1318
Flap structure specific endonuclease 1	-2,5	-1,8	Fen1	H3009B04	Mm.2952	7750
Cyclin F	-2,5	-1,9	Ccnf	H3010F01	Mm.77695	10505
Reticulocalbin 2	-2,5	-3,3	Rcn2	H3006A07	Mm.1782	4483
Pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein	-2,6	-2,0	Pscdbp	H3048B06	Mm.273905	7644
Cyclin D3	-2,7	-1,8	Ccnd3	H3149A01	Mm.246520	8744
SAFB-like, transcription modulator	-2,7	-1,8	Sltn	H3158E02	Mm.22379	8837
Ribonucleotide reductase M2	-2,7	-1,8	Rrm2	H3003F02	Mm.99	10545
Cytochrome c oxidase, subunit VIIa 2	-2,7	-2,0	Cox7a2	H3116D11	Mm.152627	1299
Coiled-coil domain containing 115	-2,7	-2,3	Ccdc115	H3104E08	Mm.379170	2917

Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	-2,8	-2,9	Cxcr4	H3006D04	Mm.1401	8454
Replication factor C (activator 1) 1	-2,9	-2,7	Rfc1	H3102B02	Mm.148877	9301
Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	-3,0	-4,8	Lpcat1	H3068A06	Mm.284649	5966
Midasin homolog (yeast)	-3,1	-2,4	Mdn1	H3011A10	Mm.24627	1745
Deoxythymidylate kinase	-3,1	-2,5	Dtymk	H3102A04	Mm.250332	6090
Retinoblastoma binding protein 5	-3,2	-2,6	Rbbp5	H3096C07	Mm.132868	3774
Olfactomedin 1	-3,2	-2,7	Olfm1	H3118F07	Mm.43278	3256
Golgi integral membrane protein 4	-3,2	-3,8	Golim4	H3117F04	Mm.249232	6258
Anaphase promoting complex subunit 7	-3,3	-2,2	Anapc7	H3022D12	Mm.37341	2806
Syntrophin, acidic 1	-3,3	-3,1	Snta1	H3028E02	Mm.1541	10442
Dual specificity phosphatase 7	-3,3	-4,4	Dusp7	H3156C05	Mm.275584	6804
Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1	-3,4	-3,2	Gdpd1	H3059F02	Mm.475631	9264
Ankyrin repeat domain 6	-3,4	-3,3	Ankrd6	H3051F01	Mm.214766	10607
TRM5 tRNA methyltransferase 5 homolog (S. cerevisiae)	-3,6	-3,5	Trmt5	H3119G07	Mm.311344	3863
Tyrosine kinase, non-receptor, 2	-3,6	-3,5	Tnk2	H3131D02	Mm.251115	9999
Mitochondrial ribosomal protein L18	-4,1	-2,5	Mrpl18	H3101D10	Mm.290166	1151
Cysteine-rich protein 1 (intestinal)	-4,1	-5,4	Crip1	H3108G04	Mm.272368	6829

7.5 Übersichtstabelle

	Array Zellversuch (J774)	PCR Zellversuch (J774)	PCR Lungenparenchym	PCR Alveolarmakrophagen
ADRP	↑	↑	±	±
CXCR4	↓	↓	±	↑
PPARγ		↑	±	±
PPARδ		±	↑	↑
PPARα			±	

Überblick über die Ergebnisse der Regulation der Genexpression in den verschiedenen durchgeführten Untersuchungen. Eine Analyse der PPAR war mittels Arrayanalyse nicht möglich, da sie auf den verwendeten Array-Chips nicht enthalten waren. Die RNA-Konzentration für PPAR α war im Zellversuch und den analysierten Alveolarmakrophagen für eine valide Messung zu gering.

(↑ = Up-Regulation, ↓ = Down-Regulation, ± = kein Nachweis einer signifikanten Regulation.)

7.6 Liste der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer während meines Studiums an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen/Herren:

In Marburg:

Adamkiewicz	Grundmann	Mandrek	Voigt
Alfke		Max	
Arnold	Herrmann-Lingen	Moll	Wagner
Aumüller	Hasilik	Moosdorf	Weihe
	Hertl	Mueller	Werner
Barth	Hofmann	Müller	Westermann
Basler	Jungclas	Mutters	Westphal
Baum			Wulf
Becker	Kann	Neubauer	
Boudriot	Kill		
	Klenk	Oertel	
Cetin	Klose		
Christiansen	Koch	Radsak	
Czubayko	Koolmann	Remschmidt	
	Krieg	Renz	
Daut	Kroll	Richter	
	Kunz	Rieder	
Eilers		Röhm	
	Lang	Röper	
Feuser	Lenz	Rothmund	
	Lill		
Gerdes	Löffler	Schäfer	
Gotzen	Lohoff	Schrader	
Griss	Lorenz	Seitz	
Grzeschik		Seyberth	
Gudermann	Maier		

In Giessen:

Schneider
Weiler

Praktisches Jahr:

Hofmann
Weger
Knaus

7.7 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Wahl für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Klinische Chemie und molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg durchführen zu können. Sein Engagement, seine kritische Begutachtung und seine motivierenden Denkanstöße im Rahmen einer hervorragenden Betreuung halfen mir außerordentlich diese Arbeit fertig zu stellen. Für die Zurverfügungstellung der hervorragend ausgestatteten Labors danke ich Herrn Prof. Dr. H. Renz.

Für viele produktive Gespräche, Denkanstöße und unermüdliche Unterstützung danke ich Serdar Sel, Holger Garn und Michael Wegmann.

Für die Einführung in die experimentelle Arbeit im Labor und viele Rettungstaten danke ich allen MTA's in den Labors im Biomedizinischen Forschungszentrum, allen voran Anja Spiess.

Für die Hilfe im Tierstall und am LightCycler danke ich Henrik Jungclas. Bei Tina und Andreas möchte ich mich für die Unterstützung und die gemeinsamen Stunden im Tierstall bedanken.

Vielen Dank an Dr. Michael Krause und Dr. Birgit Samans für die Bereitstellung der Microarrays und die große Hilfe bei der Auswertung.

Mein tiefer Dank gilt an dieser Stelle meiner Mutter und Hubert für Ihre immerwährende Unterstützung und Hilfe. Außerdem gilt mein Dank meinen Großeltern für Ihre Unterstützung und meiner Schwester Katrin und meinem Bruder Michael für Ihre Hilfe bei der Korrektur. Zuletzt bedanke ich mich bei Isa, Harry, Elmar, Steffi und vor allem Corinna für Ihre Unterstützung, Motivation und Ihr Verständnis während der gesamten Zeit.